

In-vitro-Versuche zur Bestimmung
des Wirtsspektrums und zur Gewinnung
von infektiösem Virus bei dem defekten
Paramyxovirus 107

Cornelia Pfeil

1976

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Angefertigt unter der Leitung von PD Dr. P. A. Bachmann

In-vitro-Versuche zur Bestimmung des Wirtsspektrums und zur Gewinnung von infektiösem Virus bei dem defekten Paramyxovirus 107

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

von

**Cornelia Pfeil
aus Wittenburg**

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Priv.-Doz. Dr. P.A. Bachmann

Korreferent: Prof. Dr. P. Walter

Tag der Promotion: 27. Februar 1976



1976

Cornelia Pflü
aus Wiesbaden

München 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum</u>	2
2.1. Defekte RNS-haltige Viren	2
2.2. Definition	2
2.3. Eigenschaften defekter Viren	3
2.3.1. Strukturelle Eigenschaften	3
2.3.2. Physikalische Eigenschaften	5
2.3.3. Biologische Eigenschaften defekter Partikel	6
2.3.3.1 Interferenz defekter Viruspartikel	7
3. <u>Spezielle Virussysteme mit defekten Partikeln</u>	14
3.1. Defekte interferierende Viren	14
3.1.1. Defekte Partikel des Reovirus Typ 3	14
3.1.2. Defekte Partikel von Influenza-Virus	15
3.1.3. Defekte Partikel im Poliovirus-System	15
3.1.4. Defekte Partikel von Sindbis-Virus	16
3.1.5. Defekte Partikel des Sendai-Virus	17
3.1.6. Defekte Partikel des Virus der Vesikulären Stomatitis (VSV)	18
3.1.7. Defekte Partikel des Tollwut-Virus	20
3.1.8. Defekte Partikel der Lymphozytären Choriomeningitis (LCM)	21
3.2. Masern-SSPE, Rinderpest, Staupe, 107 Virus	23
3.2.1. Eigenschaften	23
3.2.2. SSPE-Virus	26
3.2.3. Vorkommen und Charakter defekter Masern-SSPE-, Staupe-, Rinderpest- und 107-Virus-Partikel	28

3.2.4.	Verhalten von defekten Masern-SSPE-viren in Zellkulturen	30
3.2.5.	Paramyxovirus 107	31
4.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	33
4.1.	Material und Methoden	33
4.1.1.	Virus	33
4.1.2.	Zellkulturen	
4.1.2.1	Herstellung der Primärzellkulturen	33
4.1.2.2	Subkulturen	36
4.1.2.3	Zell-Linien	37
4.1.3.	Medien	37
4.2.	Infektion von Zellkulturen	38
4.3.	Nachweis der Virusvermehrung	39
4.3.1.	Auftreten cytopathischer Effekte	39
4.3.2.	Antigennachweis mit Hilfe der Immunofluoreszenz (IF)	40
4.4.	Untersuchung der Zellkulturen auf Infektiosität	41
4.5.	Virusreinigung und Elektronenmikroskopie	41
4.6.	Trypsinbehandlung	43
5.	<u>Ergebnisse</u>	44
5.1.	Virusvermehrung in Zellkulturen unterschiedlicher Spezies	44
5.1.1.	Nachweis der Infektion	
5.1.1.1	Cytopathische Veränderungen	46
5.1.1.2	Nachweis von viralem Antigen durch die indirekte Immunofluoreszenz	51
5.2.	Untersuchung der Zellkulturen auf Infektiosität	54
5.3.	Konzentrierung und Untersuchung von Überständen infizierter BT und BHK-Zellen	56
6.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	58
7.	<u>Zusammenfassung</u>	61
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	63

1. Einleitung

Vor einiger Zeit wurde im Rahmen ätiologischer Untersuchungen über die als Zoonose angesehene, beim Kind auftretende Subakute Sklerotisierende Panenzephalitis (SSPE) von einem Rind mit sporadischer Enzephalomyelitis ein Paramyxovirus (Isolat 107) isoliert, das sowohl mit Staupe- und Masernvirus als auch mit dem Masern-ähnlichen SSPE-Erreger genetisch verwandt ist. Inwieweit das PMV 107 bei der menschlichen Erkrankung eine Rolle spielt, ist unbekannt.

Die Isolierung des PMV 107 gelang nur durch Anzüchtung über Gehirnexplantatkulturen, wobei bei der Vermehrung kein zellfreies, infektiöses Virus gebildet wurde. Die Infektiosität des Agens war strikt zellgebunden und ging mit der Zerstörung der Zelle verloren.

Da über die Art des Defektes bei der Vermehrung des PMV 107 nichts bekannt war, andererseits bei ähnlichen Isolaten von SSPE Virus die Produktion von infektiösem Virus nach Adaptation an andere Zellarten induziert werden konnte, sollte in dieser Arbeit versucht werden, das Wirtsspektrum des PMV 107 in vitro zu ermitteln und Zellarten zu finden, in denen die Infektion produktiv ist.

Daneben wurde versucht, durch Behandlung gereinigter Virusfraktionen mit Trypsin eine Infektiosität zu erreichen.

2. Schrifttum

2.1 Defekte RNS-haltige Viren

2.2 Definition

Nach HUANG (1973) werden defekte Viruspartikel folgendermaßen charakterisiert:

Defekte Partikel enthalten nur einen Teil des viralen Genoms, aber normale virale Strukturproteine.

Sie werden nur in Gegenwart des homologen intakten Virus vermehrt.

Dabei unterliegen sie einem zyklischen Vermehrungsprozeß.

Haupteigenschaft defekter Viren ist ihre Fähigkeit, spezifisch mit der intrazellulären Genese des homologen Virus zu interferieren.

Defekte Partikel verhalten sich antigenetisch wie intakte Partikel.

VON MAGNUS (1952, 1954) beobachtete erstmals das Auftreten defekter Viruspartikel bei Influenzaviren.

HUANG et al. (1966) beschrieben das Vorkommen defekter, sogenannter "T"-Partikel beim Virus der vesikulären Stomatitis.

VON MAGNUS (1952, 1954) zeigte, daß mehrfache, unverdünnte Passagen von Influenza-3 Viren im Brutei zur Bildung von Virus mit ganz geringer Infektiosität führte. Dies wird als "Von Magnus Phänomen" bezeichnet. Wurde Virus aus einer mehrfachen Passage mit niedrigem Titer zusammen mit hochtitrigem Influenzavirus auf das Brutei verimpft, so war das Viruswachstum stark eingeschränkt.

Nachfolgende Untersuchungen durch LIEF und HENLE (1956) ergaben, daß die defekten Partikel einen geringeren Gehalt an Nukleoprotein besaßen als die Präparationen mit hoher Infektiosität.

Da Influenzaviren die Interferonbildung induzieren und stark pleomorph sind, sich also die Partikel nicht eindeutig trennen lassen (ALMEIDA und WATERSON, 1969), wurden neue Virussysteme mit genetisch defekten Partikeln gesucht. HUANG (1966) untersuchte defekte Partikel des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV).

2.3. Eigenschaften defekter Viren

2.3.1. Strukturelle Eigenschaften

Defekte Viruspartikel unterscheiden sich morphologisch von dem intakten homologen Virus.

Defekte Partikel von Virusarten mit kubischer Struktur sind in der Regel von gleicher Größe wie das infektiöse Virus, während bei Viren mit helikaler Struktur der Durchmesser defekter Partikel geringer ist als der des homologen infektiösen Partikels (HUANG, 1973).

HUANG et al. (1966a) trennten intakte VSV-Partikel von defekten Partikeln im CsCl-Dichtegradienten. Sie fanden, daß defekte VSV-Partikel fast rechteckig waren und einen Durchmesser von 65 nm hatten, gegenüber dem intakten Partikel, das zylindrisch gebaut ist, mit den Ausmaßen von 65 x 180 nm.

Merkmal defekter Partikel ist ein spezifischer Mangel an viraler Information. Er entsteht entweder dadurch, daß insgesamt kürzere, damit leichtere Nukleinsäurestücke vorliegen (KINGSBURY et al., 1970), wie z.B. bei defekten Masern-

viren (HALL und MARTIN 1974a), oder durch den Verlust von segmentierten viralen Genomen, wie z.B. bei Reoviren (NONOYAMA et al., 1970).

KINGSBURY et al. (1970a) fanden für defektes Sendai-Virus eine RNS, die eine Sedimentationskonstante von 19 S und 25 S, gegenüber 50 S bei intakten Partikeln hatte. COLE und BALTIMORE (1973) demonstrierten in Hybridisierungs-experimenten, daß defekten Poliomyelitis-Viren ca. 15% virale RNS fehlt, daß sie aber die gleichen Nukleotide enthalten.

Ebenso zeigten HALL und MARTIN (1973) für defekte Masern-Viruspartikel einen Verlust an viraler RNS. RNS defekter Masern-Partikel sedimentierte bei 18 S und 4 S, gegenüber 52 S im Falle der RNS intakter Partikel.

Daß defekte Partikel nicht nur insgesamt kürzere Nukleinsäurestücke besitzen, sondern daß auch ganze Genom-Stücke fehlen können, beobachteten NONOYAMA et al. sowie NONOYAMA und GRAHAM (1970a, b) bei einem Reo-3 Virus. In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese fehlte bei defekten Partikeln das größte von 10 RNS-Genomen.

Das Fehlen bestimmter Genomteile hatte aber keinen Einfluß auf den Proteingehalt der defekten Viren, da COLE et al. (1971) sowie COLE und BALTIMORE (1973) nachwiesen, daß defekte Poliovirus-Partikel alle vier Kapsid-Polypeptide besitzen und daß diese Proteine im gleichen Verhältnis vorkommen wie bei intakten Partikeln.

Die gleiche Eigenschaft wiesen HUANG et al. (1966) sowie PETRIC und PREVEC (1970) für defekte VSV-Partikel nach, nämlich daß sich das Virus in der Polypeptidstruktur und den Hüllsubstanzen nicht von intakten Partikeln unterscheidet.

Auch für das Masernvirus wurden diese Befunde von HALL und MARTIN (1973) bestätigt.

KINGSBURY und PORTNER (1970) kamen mit Sendai Virus zum gleichen Ergebnis.

Im Gegensatz dazu steht der Befund von BLOUGH und MERLIE (1970), die Abweichungen der Lipidstruktur bei defekten Influenzaviren fanden. Ihre Ergebnisse sind schwer nachprüfbar, da Influenzaviren einen starken Pleomorphismus aufweisen und sich die intakten und defekten Partikel und ihre Proteine nicht sauber trennen lassen.

2.3.2. Physikalische Eigenschaften

Aufgrund ihres geringeren Nukleinsäuregehaltes und damit häufig verbunden aufgrund ihrer geringeren Größe sind defekte Partikel im Dichtegradienten leichter als intakte Partikel (HALL und MARTIN, 1974 a).

HACKETT (1964) klärte auf, daß das Phänomen der Interferenz streng an diese spezifisch leichteren oder kleineren Partikel geknüpft ist.

Neben dem Größenunterschied, den defekte VSV-Partikel gegenüber intakten Partikeln aufweisen, haben sie auch eine geringere Dichte von $1,185 \text{ g/cm}^3$ gegenüber $1,211 \text{ g/cm}^3$ (HUANG 1966a). Ähnliche Befunde beschrieben KINGSBURY et al. (1970) für defektes Sendai-Virus, das ebenfalls eine geringere Dichte aufweist als intaktes Sendai-Virus. Defekte Partikel sedimentieren bei 400 S gegenüber 1000 S normaler Partikel.

Bei Reoviren sind die physikalischen Unterschiede zwischen defekten und intakten Partikeln nur gering.

Dies demonstrierten NONOYAMA et al. (1970), indem sie erst die Virushülle mit Trypsin entfernen mußten, um eine geringere Dichte der Nukleokapside defekter Partikel von

0,015 g/cm³ im CsCl-Gradienten sichtbar zu machen (1,43 zu 1,415 g/cm³).

COLE et al. (1971) fanden, daß defekte Polioviruspartikel um 0,015 bis 0,02 g/cm³ leichter sind als intakte Partikel (1,34 g/cm³ zu 1,325 g/cm³).

2.3.3. Biologische Eigenschaften defekter Partikel

Obwohl defekte Partikel in fast allen Viruspräparationen vorkommen, können Entstehungsort und Mechanismus nicht von dem der normalen Viruspartikel abgegrenzt werden (HUANG, 1973).

Defekte Partikel entstehen intrazellulär aus einer Mutation, die stets den Verlust eines Teils des Genoms nach sich zieht. Wodurch diese Mutationen bewirkt werden, ist nicht bekannt.

Nach Klonisierung von Viren durch mehrere Plaqueisolierungen erhält man für einige Zeit nur intakte Viruspräparationen. Wird diese reine Präparation über mehrere Passagen vermehrt, so treten neue defekte Partikel auf. Gefördert wird ihre Bildung durch Passagen mit hoher Infektionsdosis in einer Einschnitt-Vermehrung. Diese höhere Produktion von defekten Partikeln beruht auf der größeren Wahrscheinlichkeit, daß eine Wirtszelle von dem intakten Helfervirus und defekten Partikeln gleichzeitig infiziert wird.

Defekte Partikel treten je nach Virusart nach 3 (VSV) bis 18 (Poliovirus) Viruspassagen auf (HUANG, 1973). Die Zellart, in der das Virus passagiert wird, kann die Entstehung von defekten Partikeln hemmen oder fördern.

Welche Faktoren hierbei eine Rolle spielen, ist unbekannt, ein Einfluß durch Interferonproduktion kann ausgeschlossen werden, da bei diesen Viren kein Interferon nachgewiesen werden konnte.

Alle defekten Partikel haben mit dem RNS-Verlust die Fähigkeit verloren, sich unabhängig von dem intakten Virus zu vermehren (HUANG 1973). Der größte Teil interferiert intrazellulär mit der Bildung des homologen, intakten Virus. Je nach Virusart sind unterschiedliche genetische Informationen für die Vermehrung verlorengegangen. Dies bedingt Unterschiede in den biologischen Eigenschaften.

So hat defektes Sendai-Virus seine Infektiosität verloren, die hämagglutinierenden Eigenschaften aber beibehalten (KINGSBURY und PORTNER, 1970).

Bei defekten VSV-Partikeln wurde Verlust der Polymeraseaktivität festgestellt; sie sind nicht in der Lage, komplementäre RNS zu bilden (PERRAULT und HOLLAND 1972). Die Autoren vermuten, daß defekte VSV-Partikel sich bis zum Replikationsschritt der viralen RNS selbständig vermehren, daß die messenger-RNS noch in virale RNS umgeschrieben, aber dann nicht mehr vermehrt wird.

Defektes Poliovirus dagegen kann sich selbständig vermehren, nur nicht die Bildung von Hüllproteinen induzieren (COLE und BALTIMORE 1973). Diese Kapsidproteine werden durch die verlorene Sequenz nahe dem 5'-Ende der Poliovirus-RNS kodiert.

2.3.3.1. Interferenz defekter Viruspartikel

Kennzeichen fast aller defekten Viruspartikel ist ihre Fähigkeit, in-vitro mit der Replikation des intakten Virus zu interferieren. Diese Interferenz ist nach HUANG (1966b, 1973) streng Virustyp-spezifisch. Dies wurde bewiesen durch zahlreiche Superinfektionen mit anderen Sero-
typen, bei denen keine Interferenzphänomene auftraten (HUANG und WAGNER 1966).

Defekte Interferierende (DI) Partikel zeigen ihre Aktivität intrazellulär. Ihre Interferenz äußert sich in der Verringerung der Produktion von infektiösem Virus in einem Zellsystem im logarithmischen Verhältnis.

COLE und BALTIMORE (1973b) zeigten für das Poliovirussystem, daß je höher der Prozentsatz an defekten Partikeln zu Beginn eines Infektionszyklus ist, desto geringer ist die Ausbeute an infektiösem Virus. Ein fünffacher Überschuß an defekten Partikeln produzierte einen 98%igen Verlust an infektiösem Virus. Besonders groß ist dieser Unterschied bei den von VON MAGNUS (1952) erstmalig beschriebenen defekten Influenza-Viren; dagegen beträgt die Interferenz bei Sindbis-Virus nur $2-3 \log_{10}$ der Infektiosität (PELEG und STOLLAR, 1974).

Die intrazelluläre Interferenz läßt sich durch gleichzeitige oder in Zeitabständen erfolgende Infizierung mit defektem und normalem Virus nachweisen. COLE und BALTIMORE (1973a) infizierten HeLa-Zellkulturen zuerst mit normalem Poliovirus, dann mit defekten Partikeln und hatten kaum einen Titerverlust. Infizierten sie aber zuerst mit defekten Partikeln und dann mit normalem Virus, so war der Titerverlust deutlich.

Um zu beweisen, daß DI-Partikel nicht das Anheften und Eindringen normaler Viruspartikel verhindern, arbeiteten sie mit defekten Partikeln eines Guanidin-empfindlichen Polio-Virusstammes. Wurden Zellen mit diesem Stamm infiziert und einige Zeit darauf mit einem Guanidin-abhängigen intakten Virus, so trat keine Interferenz auf. Das intakte Virus vermehrte sich frei.

Werden defekte Partikel mit UV-Licht bestrahlt und dann mit infektiösen Viruspartikeln zusammen verimpft, so tritt keine Interferenz auf (HUANG 1966a), daraus kann geschlossen werden, daß die defekte RNS inaktiviert wird und sie der Träger der Interferenz ist.

Die spezifische Interferenz defekter Partikel mit der Bildung des intakten Virus erfolgt intrazellulär auf molekularer Basis. PERRAULT und HOLLAND (1972) konnten für defekte Partikel des VSV-Virus nachweisen, daß die Interferenz am Replikase-System einsetzt. Sie vermuten, daß defekte Partikel ein Transkriptase-Protein besitzen, aber daß die defekte RNS nicht als Modell zur Ablesung dienen kann. Da die Transkription erfolgt, liegt es nahe zu vermuten, daß Transkription und Replikation an verschiedenen Stellen des RNS-Genoms abgelesen werden.

COLE und BALTIMORE (1973) wiesen für das Polio-Virussystem nach, daß die Interferenz nicht durch Hemmungen oder durch den Verlust an Replikase-Systemen der DI-Partikel bedingt wird, sondern auf intrazellulärer Konkurrenz beruht. Defekte und intakte Viruspartikel produzieren beide RNS und Proteine. Sie brauchen die vorhandenen zellulären "Nährstoffe" gleichmäßig auf. Die defekte RNS und die intakte RNS konkurrieren gleichmäßig um den begrenzten Prokapsidpool. COLE und BALTIMORE konnten hiermit aber nicht die Anreicherung defekter Partikel in bestimmten Zellsystemen erklären.

PALMA et al. (1974) beobachteten, daß sich defekte Partikel nicht oder nur in ganz geringem Maße bei hohen pH-Werten bilden. Sie vermuten, daß damit der normale Zellstoffwechsel die Bildung von defekten Partikeln gegenüber infektiösem Virus begünstigt. HOLLAND (1974) vermutet dagegen, daß die RNS defekter Partikel einen kürzeren Vermehrungszyklus hat und so bereits günstiger um die Proteinsynthese konkurrieren kann, oder aber bereits Freisetzungsstellen besetzt hält.

Einige Zellarten sind in der Lage, die Bildung defekter Viruspartikel bestimmter Virusarten zu verhindern. So werden in MDBK-Zellen (Madin-Darby-bovine-kidney) defekte Partikel

von Influenza-Virus und VSV-Virus in ganz geringem Ausmaß gebildet (HUANG 1973).

COMPANS et al. (1964) wiesen darauf als erste hin. Sie erhielten nach Infektion mit Parainfluenza Virus SV 5 in Affennierenzellen einen geringen cytopathischen Effekt, aber hohe Virustiter. In BHK-21 Zellen dagegen sahen sie intraplasmatisch große Mengen von Nukleokapsiden, einen starken cpE, aber es ergaben sich nur niedrige Virustiter.

Die Autoren vermuten daher, daß das Wirtssystem, insbesondere die Zellmembran einen Einfluß auf Virulenz und Quantität des Virus hat.

Ähnliche Ergebnisse liegen von DARNELL und KOPROWSKI (1974) vor. Sie zogen genetische Unterschiede von primären Mäusezellen heran, um unterschiedliche Mengen defekter Partikel zu erhalten. Infizierten sie Zellen, die genetisch resistent gegenüber West-Nile-Virus—einem Flavivirus—waren, mit diesem Virus, erhielten sie eine sehr geringe Virusausbeute. Infizierten sie dagegen West-Nile-Virus-sensible Zellkulturen der gleichen Art, so erhielten sie hohe Virustiter. Äußere Einflüsse, besonders Interferonbildung, konnten ausgeschlossen werden.

In diesem Zusammenhang ist der Befund von PALMA und HUANG (1974) interessant, die eine zyklische Vermehrung defekter und normaler VSV-Partikel beobachteten.

Dies stimmt auch mit Ergebnissen von EHRNST et al. (1974) überein, die eine zyklische Vermehrung von Masern-Virus in einer chronisch infizierten Zellkultur fanden.

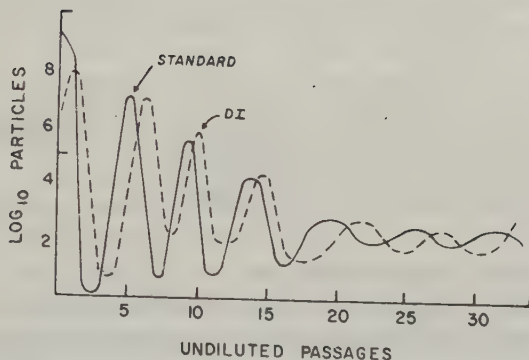


Abb. 1: Zyklische Produktion von intaktem Virus
und defekten VSV Partikeln (nach HUANG 1973)

Dabei verimpfte man gereinigte intakte Partikel und gereinigte defekte VSV-Partikel zusammen. Während 30 Passagen zeigte sich eine zyklische, überlappende Synthese beider Viruspartikel. Einem Anstieg an defekten Partikeln folgte eine geringere Bildung intakter Partikel. Die intrazelluläre virusspezifische RNS-Synthese korrelierte mit der Produktion extrazellulärer Partikel. Wurden große Mengen defekter Partikel produziert, so fanden sich regelmäßig im Zytoplasma große Mengen defekter Nukleokapside. Man identifizierte sie durch ihre Resistenz gegenüber Ribonuklease. Nach 20 Viruspassagen hielten sich intakte und defekte Partikel die Waage.

Es bleibt zu untersuchen, ob durch diese zyklische Produktion defekter Viren nicht auch ein stabiler Status er-

reicht werden kann, nach dem fast nur noch defekte Partikel ausgeschleust werden und intakte Partikel in so geringer Zahl auftreten, daß sie keine Krankheit mehr induzieren können.

HUANG und BALTIMORE (1970), PALMA und HUANG (1974) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Bildung defekter Viruspartikel und Krankheitsprozessen.

Sie stellen drei Modellvorstellungen vor:

Defekte Partikel werden nicht gebildet, die Krankheit verläuft normal.

Defekte Partikel und intakte Partikel werden gebildet, DI-Partikel nehmen stärker zu als das intakte Virus. Daraus folgt, daß nur noch wenig intaktes Virus gebildet wird. Diese geringe Menge kann vom Wirtsorganismus neutralisiert werden, die Krankheit erlischt.

Defekte und intakte Partikel werden gebildet. Die Synthese von infektiösem und defektem Virus ist durch Einfluß des Wirtes, des pH-Wertes etc. im Gleichgewicht, es werden nur geringe Virusmengen produziert. Der Wirtsorganismus ist nicht in der Lage, das Virus zu neutralisieren; es kommt zu einer subakuten oder latenten Infektion.

Eine vierte Möglichkeit der Entstehung einer Krankheit durch defekte Viruspartikel sehen HOLLAND und VILLARREAL (1974) darin, daß defekte Viruspartikel die Virus-Transkriptase des Standardvirus blockieren und so zu einer persistenten, nicht zellzerstörenden Infektion führen können.

An einem Modell prüften DOYLE und HOLLAND (1973), ob durch Verabreichung defekter VSV-Partikel auch in-vivo eine Interferenz mit intaktem Virus auftritt. Sie verimpften de-

defekte VSV-Partikel und virulentes VSV-Virus intrazerebral in die Maus. Wesentlich war es, die Präparation gänzlich von infektiösem Virus zu reinigen, denn wurde infektiöses VSV-Virus intrazerebral in junge Mäuse inokuliert, so erkrankten und starben die Tiere in kurzer Zeit.

Hohe Dosen hochgereinigter defekter "T"-Partikel zusammen mit niedrigen aber normalerweise letalen Dosen von infektiösen VSV-Partikeln intrazerebral inokuliert, ergaben einen vollständigen Schutz.

Wurden die Tiere nach 7 Wochen noch einmal mit hohen Dosen infektiösem Virus intrazerebral infiziert, so waren sie immun. Die gereinigten defekten Partikel des Indiana VSV-Stammes schützten die Tiere nicht gegen eine Infektion mit infektiösem VSV New Jersey Serotyp. Dies zeigt, daß der in-vivo-Schutz auf homologer Interferenz beruht und nicht auf Interferon, Absättigung der VSV-Rezeptoren oder auf unspezifischen Effekten.

Geringe Dosen defekter Partikel - zusammen mit hohen Dosen von intaktem Virus inokuliert - führten zu einer schleichenden, chronischen Erkrankung mit späterem Tod. Intrazerebrale Inokulation reiner defekter Partikel ohne infektiöses Virus führte zu hohen Antikörpertitern und einer belastbaren Immunität, ohne daß die Inokulation irgendwelche Nebeneffekte oder Todesfälle verursachte.

Mit diesen Versuchen sind die in-vitro-Möglichkeiten des Krankheitsverlaufs bei Infektion mit intakten und defekten Viruspartikeln in-vivo nachvollzogen. Inwieweit defekte Viruspartikel als Prophylaxe eingesetzt werden können, bleibt zu klären.

Die Interferenz defekter Partikel mit der Produktion des homologen Virus ist verschieden von der Autointerferenz. Unter Autointerferenz wird in der neueren Literatur ein Interferenzphänomen derselben Virusart an der Zelloberfläche verstanden. Genetisch gleichartige Partikel behindern sich bei Adsorption und Penetration.

3. Spezielle Virussysteme mit defekten Partikeln

3.1. Defekte interferierende Viren

3.1.1. Defekte Partikel des Reovirus Typ 3

Reoviren besitzen kubische Symmetrie. Sie haben einen Durchmesser von 70 nm. Ihr Molekulargewicht beträgt 7×10^6 und ihre Dichte liegt zwischen 1,38 und 1,43 g/cm³. Die RNS ist doppelsträngig. Reoviren induzieren hämagglutinin-hemmende, neutralisierende und komplementbindende Antikörper. NONOYAMA et al. (1970) erhielten nach Andauung mit Trypsin zwei Virusfraktionen aus einer gereinigten Virussuspension. Die Virusfraktionen unterschieden sich in Dichte und Infektiosität.

Gereinigte Fraktionen defekter Partikel waren allein nicht infektiös für L-Zellen. Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde nachgewiesen, daß den defekten Partikeln eines von 10 Segmenten des RNS Genomes fehlte. SCHUERCH et al. (1974) fanden defekte Partikel, denen zwei RNS-Genome fehlten.

NONOYAMA und GRAHAM (1970) zeigten weiterhin, daß defekte Partikel in jeder untersuchten Reovirusfraktion auftraten. Ob diese defekten Partikel mit der Vermehrung des homologen Virus interferierten, wurde nicht geklärt.

FIELDS (1972) brachte eine defekte, temperaturempfindliche Reovirus-3 Mutante in Zusammenhang mit einem veränderten Krankheitsbild. Diese Mutante ist nicht in der Lage, Hüllproteine zu bilden. Sie ist nur in geringem Maß für Zellkulturen infektiös. Wird dieses defekte Virus jüngeren Ratten intrazerebral injiziert, so erkrankten die Tiere an einer schleichend, degenerativen Enzephalitis innerhalb von 8 Monaten. Bei Infektionen mit dem intakten Virus starben die Tiere innerhalb von 2 Wochen.

3.1.2. Defekte Partikel von Influenza-Virus

Obwohl Influenza-Virus die Virusart war, bei der zuerst defekte interferierende Partikel entdeckt wurden (VON MAGNUS 1952), wurden sie nicht genau untersucht. Dies liegt daran, daß Influenza-Viren stark pleomorph sind und Interferon induzieren. Man kann deshalb nie genau defekte von intakten Viruspartikeln trennen, ebensowenig wie man das Phänomen der Interferenz eindeutig an einem genetischen Defekt des Virus festmachen kann. Deshalb erscheint es sinnvoll, auf defekte Influenza-Partikel nicht näher einzugehen.

3.1.3. Defekte Partikel im Poliovirus-System

Humanes Poliovirus ist ein Picornavirus, das in 3 Serotypen vorkommt. Es wird in die Untergruppe der Enteroviren eingeordnet. Poliovirus besitzt eine kubische Symmetrie und einen Durchmesser von 20-30 nm. Die Dichte liegt bei $1,34 \text{ g/cm}^3$. Die RNS ist doppelsträngig mit einem Molekulargewicht von $2,6 \times 10^6$. Poliovirus induziert neutralisierende und komplementbindende Antikörper.

COLE et al. (1971) sowie COLE und BALTIMORE (1973a) isolierten defekte Polioviruspartikel. Diese Partikel waren durch eine geringere Dichte im CsCl-Gradienten - $1,325 \text{ g/cm}^3$ gegenüber $1,34 \text{ g/cm}^3$ - und durch eine langsamere Sedimentationsgeschwindigkeit im Saccharose-Gradienten gekennzeichnet. Ihre RNS sedimentierte langsamer als diejenige der intakten Viruspartikel. Sie hatte auch eine größere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit.

In Hybridisierungs-Experimenten zeigte sich, daß die defekte RNS in 80-90% mit der Basensequenz der normalen RNS übereinstimmte, d.h. ca. 15% der viralen RNS fehlten. Beide Viruskapside haben die gleiche Polypeptid-Sequenz. Funktionell besteht der Defekt darin, daß defekte Partikel nicht in der Lage sind, komplette Kapsid-Proteine zu synthetisieren. Der geringere Anteil an Kapsid-Proteinen korreliert genau mit dem um 15% geringeren RNS Gehalt. Dies bedeutet, daß ein Stück RNS zur Induzierung kompletter Kapsid-Proteine fehlt. In einer gemischten Viruspopulation wird diese Funktion jedoch von dem intakten, homologen Virus übernommen, so daß Unterschiede bei den Virusproteinen nicht feststellbar sind.

Defekte Polioviruspartikel interferieren mit der Bildung des intakten Virus (COLE und BALTIMORE, 1973b). Nach einer Einschnitt-Vermehrung defekter und intakter Partikel war der Infektionstiter deutlich geringer als der einer Viruspräparation mit intakten Partikeln allein.

3.1.4. Defekte Partikel von Sindbis-Virus

Sindbis-Virus ist ein Alphavirus innerhalb der Togaviridae. Es ist kubisch gebaut mit einem Durchmesser von 40-60 nm. Das Virus ist behüllt. Seine RNS ist einsträngig. Sie hat ein Molekulargewicht von 10^6 .

PELEG und STOLLAR (1974) brachten auftretende Interferenzphänomene in einer persistent mit Sindbis-Virus infizierten Insekten-Zelllinie in Zusammenhang mit einer Virusmutante, die kleine Plaques bildete.

SCHLESINGER et al. (1974) hingegen isolierten defektes Sindbis-Virus aus einer BHK-(Baby-hamster-kidney) Zellkultur. Die defekten Viruspartikel enthielten 20 S RNS ge-

genüber 26 S RNS normaler Partikel. Dies entspricht ungefähr dem halben Molekulargewicht. In Hybridisierungs-Experimenten mit normaler RNS wurde dieser 50% Wert bestätigt. Funktionell unterscheidet sich die 20 S RNS dadurch, daß sie in-vivo keine Polysomen bindet und in-vitro nicht übersetzt (translated) wird. Sie kann also nur zusammen mit dem homologen intakten Virus vermehrt werden.

3.1.5. Defekte Partikel des Sendai-Virus

Sendai-Virus (HVJ) gehört in die Gruppe der Paramyxoviren. Es besitzt eine helikale Symmetrie und weist einen Durchmesser von 120 -250 nm auf. Sendai-Virus ist von einer Hülle umgeben. Die Dichte des Virus liegt bei 1,25 g/cm³. Die RNS ist einsträngig.

Sendai-Virus hat hämagglutinierende Eigenschaften und trägt eine Neuraminidase.

KINGSBURY et al. (1970a) fanden nach unverdünnten Viruspassagen defekte Viruspartikel, die 19 S und 25 S RNS enthielten, im Gegensatz zur 50 S RNS des intakten Virus.

KINGSBURY et al. (1970b) vermuten aber, daß nicht allein hohe Virusmengen notwendig sind, um defekte Partikel zu erzeugen, sondern daß auch das Wirtssystem einen Einfluß auf die Entstehung sub-genomischer RNS hat. Diese Vermutungen werden von den Versuchen von MAENO et al. (1970) sowie HOMMA und OHUCHI (1973) in gewisser Weise bestätigt. Sie behandelten defektes Sendai-Virus mit Trypsinlösungen und erhielten dadurch neue Virusaktivitäten.

HOMMA (1973) konnte mit milder Trypsinbehandlung nicht infektiöses Sendai-Virus, das auch keine hämolysierenden und fusionierenden Eigenschaften zeigte, in einen aktiven Zustand überführen. Das gleiche gelang ihm auch, wenn er nicht infektiöses Sendai-Virus über eine Eipassage laufen ließ.

Es zeigte sich, daß das Wirtssystem entscheidend war für die Ausbildung bestimmter Hüllglykoproteine, die die vorhergenannten Aktivitäten trugen. Denn wie SCHEID und CHOPPIN (1974) nachwiesen, hängt die Bildung von Hüllproteinen des Sendai-Virus von der Wirtszelle insofern ab, als in bestimmten Zellsystemen (z.B. MDBK-Zellen) ein Vorläuferprotein Fo des sogenannten "kleinen Glykoprotein" F (MG 53000) nicht gespalten wird. Damit wird das F-Glykoprotein nicht gebildet. Dieses F-Glykoprotein scheint aber eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung von Infektiosität, Hämolyse und Hämagglutinin zu spielen. Sein Fehlen führt zu einem Defekt der Virushülle.

In anderen Zellsystemen aber, in denen Fo zu F gespalten wird, kann nicht infektiöses Virus seine Infektiosität wieder erhalten.

6/94-Virus, ein Parainfluenza-1-Virus, das aus Gehirnzellen Multiple Sklerose Kranker durch Fusion mit CV-1-Zellen gewonnen war (ter MEULEN et al. 1972c), konnte durch eine Eipassage oder durch die Kultivierung in Mäusemakrophagen bzw. durch eine milde Trypsinbehandlung in einen infektiösen Zustand überführt werden.

3.1.6. Defekte Partikel des Virus der Vesikulären Stomatitis (VSV)

VSV gehört in die Gruppe der Rhabdoviren. Das Virus besitzt eine helikale Symmetrie und ein geschoßförmiges Aussehen. Sein Durchmesser beträgt 180 x 65 nm, ein Innenkörper mit 18 nm Durchmesser ist sichtbar. VSV ist behüllt, seine Hülle trägt Hämagglutinin. Die RNS ist einsträngig mit einem Molekulargewicht von 5×10^6 .

VSV ist das Virus, bei dem genetisch defekte Partikel am genauesten untersucht wurden.

So trennten HUANG et al. (1966a) intakte VSV-Partikel von den defekten Partikeln im CsCl-Dichtegradienten. Die defekten, sogenannten T-Partikel waren fast rechteckig mit einem Durchmesser von 65 nm gegenüber den intakten B-Partikeln, die wie alle Rhabdoviren zylindrisch mit einem Durchmesser von 65 x 180 nm gebaut waren.

Die Dichte der T-Partikel betrug 1,185 gegenüber 1,211 g/cm³. Morphologisch waren T- und B-Partikel ansonsten gleich, nur waren die T-Partikel um ca. 1/3 kürzer. Antigenetische Unterschiede bestanden nicht.

HACKETT et al. (1967) kamen mit einem VSV-Stamm zu ähnlichen Ergebnissen. Dies stimmt gut mit Daten über den RNS-Gehalt von defekten und intakten Partikeln überein. Denn HUANG et al. (1966) und BROWN et al. (1967) wiesen nach, daß der RNS-Gehalt defekter VSV-Partikel um ein Drittel geringer ist als derjenige von intakten Partikeln.

PALMA et al. (1974) stellten bei Infektionsversuchen mit radioaktiv markierter RNS von defekten VSV-Partikeln folgendes fest: Die Interferenz erfolgt intrazellulär, sie wird nicht durch Interferon hervorgerufen und sie ist streng an die virale RNS gekoppelt. Wurden nämlich defekte VSV-Partikel vor der Infektion mit UV-Licht bestrahlt, so trat keine Interferenz auf.

Defekte VSV-Partikel enthalten Nukleinsäuren mit einer geringeren Sedimentationskonstante als derjenigen von intakten Partikeln. Die RNS defekter VSV-Partikel sedimentiert hauptsächlich bei 19 S, während die vollständige RNS des intakten Virus bei 40 S sedimentiert.

PERRAULT und HOLLAND (1972), sowie PALMA et al. (1974) konnten durch das Abschalten der viralen RNS-Replikation mit Cycloheximid - ohne daß der Transkriptionsschritt beeinträchtigt wurde - darstellen, daß damit auch die Bildung defekter Partikel abgeschaltet wurde. Es scheint da-

mit festzustehen, daß defekte VSV-Partikel während der RNS-Vermehrung und nicht während der Transkription entstehen. Dem stehen Versuche von NGAN et al. (1974) gegenüber, die den Defekt durch eine lösliche Komponente des Transkriptase-Systems verursacht sehen wollen.

Für die günstigere Vermehrung der defekten Partikel gegenüber intakten Partikeln und damit für das Auftreten der Interferenz, bieten PERRAULT und HOLLAND (1972) zwei Erklärungsmöglichkeiten:

Das (die) Replikase-Enzym(e) hat (haben) eine größere Affinität zu defekten RNS-Molekülen als zu intakten RNS-Molekülen. Dieser Vorgang ist unabhängig von der Molekülgröße. Oder aber es liegt eine zeitliche Verschiebung vor! Während die Replikase auftritt wird die intakte RNS transkribiert und kann nicht vermehrt werden bis die Transkription abgeschlossen ist. Defekte RNS wird dagegen nicht transkribiert und kann so bereits mit dem Auftreten der Replikase vermehrt werden.

3.1.7. Defekte Partikel des Tollwut-Virus

Das Tollwut-Virus ist ein Rhabdovirus. Der Aufbau entspricht dem des VSV, seine Größe beträgt 200 x 80 nm. Tollwutvirus hat eine helikale Struktur; seine Dichte beträgt 1,17 g/cm³. Das Virus besitzt hämagglutinierende Eigenschaften. Seine RNS ist einsträngig und hat ein Molekulargewicht von $4,6 \times 10^6$. Sie sedimentiert bei 45 S (KUWERT et al. 1972).

KOPROWSKI (1954) sowie KOPROWSKI et al. (1954) zeigten, daß unverdünntes HEP-Virus nach intrazerebraler Injektion im Hamster keine Krankheit auslöst, während bei Infektion mit hochverdünntem Virus (1 : 5000) die meisten Tiere sterben.

CRICK und BROWN (1974) konnten diese Befunde auch morphologisch durch das Auffinden von defekten Tollwutviruspartikeln bestätigen. Sie fanden durch Reinigung im Saccharose-Dichte-Gradienten Partikel, die um 1/3 kürzer waren als intakte Partikel, Die kürzeren Partikel hatten eine 10-bis 100-fach niedrigere Infektiosität. Die RNS der defekten Partikel sedimentierte bei 20 S gegenüber 45 S bei normaler RNS. An die RNS waren auch interferierende Eigenschaften gebunden, denn die Infektion mit defekten und intakten Partikeln ergab einen Virustiter von $10^{2,7}$ ID₅₀/0,03 ml gegenüber $10^{5,7}$ ID₅₀/0,03 ml bei Infektion mit intaktem Virus.

HUMMELER et al. (1967) hatten bereits über kürzere Tollwutpartikel berichtet, aber sie knüpften keine biologische Funktion an diese Partikel.

Fisch-Rhabdoviren haben nach DE KINKELIN(1974) einen hohen Anteil an defekten interferierenden Partikeln.

3.1.8. Defekte Partikel des Virus der lymphozytären Choriomeningits (LCM)

LCM-Virus gehört in die Gruppe der Arenaviren, deren Mitglieder eine runde bis ovoide Gestalt und einen Durchmesser zwischen 50 und 300 nm besitzen (PFAU 1974). Die Dichte des LCM Virus entspricht mit 1,18 g/cm³ derjenigen der anderen Arenaviren. Auch das Komplement-bindende Antigen ist bei allen Arenaviren vorhanden. Die RNS von LCM-Virus ist einsträngig und sedimentiert bei 31 S und 23 S, dies entspricht einem Molekulargewicht von $2,1 \times 10^6$ und $1,1 \times 10^6$. Hierbei scheint die schwerere RNS wirtsspezifische ribosomale RNS zu sein, die in das Virus eingebaut wird (PEDERSEN 1973).

Da eine in-vivo Persistenz des LCM-Virus in Mäusen und Nagern seit langem bekannt ist, sind die in-vitro Eigenschaften des LCM Virus im Hinblick auf einen genetischen Defekt des Virus von besonderem Interesse.

WELSH et al. (1972) fanden, daß mit der Vermehrung von LCM-Virus in Zellkulturen eine Interferenz verbunden ist. Hohe Infektionsdosen in Zellkulturen resultierten in niedrigen Virustitern. In zahlreichen Zellkulturen persistierte das LCM Virus über lange Zeit, ohne einen cytopathischen Effekt zu verursachen, obwohl noch infektiöses Virus in geringer Menge freigesetzt wurde. Aus diesen Kulturen wurden aber in zyklischen Abständen größere Mengen infektiöses Virus freigesetzt (STANECK et al. 1972). Dies entspricht der zyklischen Produktion defekter VSV- und Masern-Partikel.

Andererseits wurde beobachtet, daß persistent infizierte Kulturen überhaupt kein infektiöses Virus mehr freisetzen, obwohl, wie LEHMANN-GRUBE et al. (1969) nachwiesen, noch LCM-artige Partikel im Überstand gefunden wurden. Diese interferierenden Partikel haben eine geringere Dichte als das intakte Virus (POPESCU 1975) werden aber von spezifischen Antiseren voll neutralisiert.

Fragwürdig bleibt, ob die Interferenz von LCM-Virus auf einem genetischen Defekt oder auf dem Einfluß des Wirtsystems beruht, da RNS des Wirtes in das virale Genom eingebaut wird.

3.2. Masern-SSPE, Rinderpest, Staupe, 107 Virus

3.2.1. Eigenschaften

Das Masern-Virus gehört zusammen mit dem Staupe- und dem Rinderpestvirus in eine eng verwandte Gruppe innerhalb der Paramyxoviren.

Diese Verwandtschaft besteht sowohl serologisch als auch aufgrund physikalisch-chemischer Eigenschaften. Nach MELNICK und McCOMBS (1966) wird diese Gruppe Medipest-Viren genannt.

Die Viren sind sphärisch bis ovoid (WATERSON 1965, APPEL et al. 1972, PLOWRIGHT 1968). Im Elektronenmikroskop (SCHLUEDERBERG 1971) und mit Hilfe der Ultrazentrifugation wurden ihre Durchmesser von 120 - 270 nm gemessen. Einige Partikel können aber bis zu 750 nm groß werden. Die Viren sind behüllt. Nach HALL und MARTIN (1973) ist die Hülle des Masernvirus zweischichtig und 10 - 20 nm dick. Die Hülle ist eine Lipidmembran, die von Oberflächenprojektionen bedeckt ist und zwei Glykoproteine besitzt. Mit den Oberflächenprojektionen des Masern-Virus sind die hämagglutinierenden und fusionierenden Eigenschaften des Virus verbunden. Staupe- und Rinderpest-Virus besitzen diese Eigenschaften nicht (WATERSON 1965, NAKAI et al. 1969). Das Nukleokapsid weist eine helikale Symmetrie auf (BUSSEL und WATERS 1974, NAKAI et al. 1969). Es enthält nur ein Molekül einsträngiger RNS. Das Molekulargewicht beträgt $6,0 \times 10^5$ (KINGSBURY 1970). Masernvirus sedimentiert im CsCl-Gleichgewichts-Gradienten bei 280 S, seine Dichte wurde von HALL und MARTIN (1973) zu $1,30 \text{ g/cm}^3$ bestimmt; NORRBY und HAMMARSKJÖLD (1972) fanden eine Dichte von $1,305 \text{ g/cm}^3$ aber eine Sedimentationskonstante von 220 bis 265 S.

Das Nukleokapsid besteht zu ca. 5% aus RNS, der Rest ist Protein (KINGSBURY 1970, WATERS 1974). Mit dem Elektronenmikroskop gemessen (HALL und MARTIN 1972), beträgt der Durchmesser der inneren Komponente 16 nm und der Innendurchmesser 5 nm. Das Nukleokapsid hat ein für die Paramaxoviren typisches fischgrätenähnliches Aussehen. Im Nukleokapsid sind Komplement-bindende und präzipitierende Eigenschaften verankert (ÖRVELL und NORRBY 1974).

Nach KILEY et al. (1974) weist die Hauptmenge der Virus-RNS eine Sedimentationskonstante zwischen 52 und 54 S auf. Eine zweite, kleinere RNS-Fraktion sedimentiert bei 18 S. Durch Elektrophorese in Acrylamid-Gel läßt sich das Molekulargewicht der RNS exakt bestimmen. Hiernach hat die Masern-Virus-RNS ein Molekulargewicht von $6,4 \times 10^6$.

Da die drei Virusarten sehr eng verwandt sind, wird angenommen, daß Staupe- und Rinderpest-Virus-RNS die gleichen Eigenschaften wie Masern-RNS haben. Genauere Ergebnisse liegen hierüber nicht vor. Mit Hilfe der Acrylamid-Gel-Elektrophorese isolierten HALL und MARTIN (1973) bisher sechs verschiedene Polypeptide des intakten Masern-Virus. Ihre Molgewichte betragen 75600, 69000, 60000, 53000, 51000 und 45700. Dies entspricht ungefähr Werten von WATERS und BUSSEL (1973). Aus Nukleokapsiden wurde nur ein Polypeptid mit dem Molekulargewicht von 6×10^4 isoliert.

Die hämagglutinierende Aktivität ist an zwei Hüll-Glykoproteine gebunden. Nach Behandlung mit Detergens (Non-Idet-P-40) sedimentieren sie im CsCl-Dichtegradienten als einheitliche Bande bei einer Dichte von $1,26 \text{ g/cm}^3$ (HALL und MARTIN 1974).

Auch hämolysierende Aktivitäten sind an zwei Glykoproteine gebunden, die von vier Membran-Phospholipiden stabilisiert werden.

Masern-Virus besitzt ebenso wie Staupe- und Rinderpest-Virus ein weites in-vitro Wirtsspektrum und einen gleichartigen cytopathischen Effekt.

sichtlich der Empfänglichkeit verschiedener Zellkulturen und in biologischer Hinsicht. Normale Gehirnzellen und mit SV-40 Virus transformierte Zellen sind nicht empfänglich für SSPE-Virus, wohl aber für Masernvirus (ter MEULEN et al. 1972d). Biologisch bestehen große Unterschiede. Masern-Virus wurde nur in einem Fall aus Patienten-Gehirnmaterial isoliert (ter MEULEN et al. 1972a), während SSPE-Virus nur aus Hirnbiopsien isoliert wurde.

Weiterhin induziert das zellhaltige SSPE-Virus nach intrazerebraler Injektion in Frettchen (KATZ et al. 1969b) sowie in Kälbern und Lämmern (THEIN et al. 1972) mit seiner Vermehrung auch eine Enzephalomyelitis. In Hunden vermehrte sich das Virus nicht, erzeugte aber ebenfalls eine Enzephalitis (SERVAAS et al. 1973). In Babyhamstern und Baby-mäusen vermehrte sich sogar zellfreies SSPE-Virus und erzeugte eine Enzephalitis (ter MEULEN et al. 1972d).

Wildtypen des Masern-Virus aber erzeugen in all diesen Tieren unter gleichen Versuchsbedingungen keine Veränderungen. Erst an Gehirnzellen adaptiertes Virus kann eine Enzephalitis hervorrufen.

Wesentlich abweichend von Masern-Wildtypen verhalten sich defekte SSPE-Partikel. Sie können nicht als freies infektiöses Virus gewonnen werden, sondern persistieren in Zellkulturen (DOI et al. 1972, UEDA et al. 1975). Dieses SSPE-Virus hat keine hämagglutinierenden, und das Isolat von DOI hat nur ganz geringe hämadsorbierende Eigenschaften. Masern-Virus aber kann nur unter besonderen kulturellen Bedingungen in einen nicht-infektiösen, nicht-hämagglutinierenden Zustand überführt werden. Dem entspricht auch, daß zwischen der Masern-Virus-RNS und der SSPE-Virus-RNS Unterschiede gefunden wurden.

Nach YEH (1973) fanden sich in SSPE-infizierten CV₁-Zellen vier verschiedene RNS-Fraktionen, von denen zwei zu 100% hybridisierten, d.h. komplementäre Basensequenz hatten. Dies waren die 50 S und 18 S RNS. Die übrigen RNS sedi-

mentierten bei 35 S, Molgewicht $2,5 \times 10^6$, und 22 S, Molgewicht $1,0 \times 10^6$. Die 50 S RNS hatte ein Molgewicht von 6×10^6 , die 18 S RNS eines von $0,75 \cdot 10^6$. Sie entsprachen damit den von dem Masern-Virus isolierten Ribonukleinsäuretypen.

In weiteren Hybridisierungsexperimenten zeigte sich nur zu 60% Übereinstimmung zwischen 18 S SSPE-RNS und 18 S Masern-RNS. Dies legt den Schluß nahe, daß Unterschiede in der Nukleotidsequenz vorhanden sind (YEH 1973). Dem stehen neuere Ergebnisse von HALL und ter MEULEN (1975) gegenüber. Sie hybridisierten die 18 S RNS aller Medipest-Viren bis auf Rinderpestvirus. Sie fanden zwischen Masern- und SSPE-RNS eine Übereinstimmung von 85% (YEH 60%), zwischen Masern- und Staupe 29%, zwischen Masern und 107-Virus 28%, zwischen SSPE und Staupe von 44% und zwischen SSPE und 107-Virus 41%. Die Verwandtschaft zwischen Masern und SSPE scheint damit enger zu sein als von YEH (1973) angenommen. Gleichzeitig besteht eine einheitliche genetische Verwandtschaft zwischen SSPE, Staupe und 107-Virus.

3.2.3. Vorkommen und Charakter defekter Masern-, SSPE-, Staupe-, Rinderpest und 107-Viruspartikel

Für das Staupevirus und das Rinderpestvirus sind keine defekten Partikel bekannt.

Für das Masern-Virus untersuchten NAKAI et al. (1969) Partikel, die, anders als die normalen Partikel, innerhalb der Virushülle keine klar erkennbaren Nukleokapsid-Schläuche enthielten, sondern nur lose gepackte Granula. Sie vermuteten, daß diese Partikel defektes Virus seien.

Ebenso isolierten KILEY et al. (1974) aus infizierten Vero-Zellen virale RNS, die nur 10% des MG normaler Masern-Virus-RNS aufwies. Das Nukleokapsid besaß eine Sedimentationskonstante von 110 S gegenüber 200 S. Es war also

deutlich kleiner. Die Autoren stellten weiterhin fest (KILEY und PAYNE 1974), daß beide Arten von Nukleokapsiden eine Dichte von $1,31 \text{ g/cm}^3$ in CsCl hatten, d.h. ihr Verhältnis zwischen RNS und Protein war gleich.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß die zwei Arten von Nukleokapsiden - 110 S intrazellulär, 200 S intra- und extrazellulär auch strukturell ähnlich sind und daß 200 S Nukleokapside ungefähr 10 mal so lang sind wie 110 S Nukleokapside (KILEY et al. 1974). Eine dritte Nukleokapsid-Spezies von 170 S wurde nicht regelmäßig gefunden.

Die Produktion kurzer Nukleokapside mit reduzierter RNS trat vorwiegend nach unverdünnten Viruspassagen auf.

HALL et al. (1974a) verglichen die Ausbeute an RNS nach verdünnten und unverdünnten Masern-Viruspassagen in Vero-Zellen. Verdünnte Viruspassagen ergaben die normale, in infektiösen Partikeln enthaltene 50 - 52 S RNS und einen geringen, bisher unbestimmten Anteil an 4 S RNS. Nach dreimaliger unverdünnter Viruspassage traten 52 S, 18 S und 4 S RNS auf. Nach Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten enthielten die schnell sedimentierenden Viruspartikel 52 S RNS und waren infektiös, die langsam sedimentierenden Partikel enthielten 18 S RNS und waren nicht infektiös. Zwei Typen von Nukleokapsiden waren vorhanden; für die infektiösen Partikel zwischen 260 - 280 S, für die nicht infektiösen Partikel 130 - 150 S.

Die langsam sedimentierenden Partikel interferierten mit der Vermehrung der großen Viruspartikel. Es erfolgte eine signifikante Abnahme der infektiösen Virus-Plaques, wenn die beiden Fraktionen vor der Infizierung gemischt wurden (von 269 auf 87). Wurden die sub-genomischen Partikel vor der Infizierung mit UV-Licht bestrahlt, trat keine Interferenz auf.

3.2.4. Verhalten von defekten Masern-SSPE-Viren in Zellkulturen

Inwieweit defekte, sub-genomische Masernpartikel in nicht produktiven SSPE-Gehirnzellkulturen vorkommen und ob diese Partikel in Zellkulturen persistieren können, so daß die Kulturen unempfindlich für Neuinfektionen mit intaktem Masern-Virus werden, wird noch untersucht. Daß das Masern-Virus durch Mutationen andere Eigenschaften annehmen kann, zeigten KNIGHT und DUFF (1972/74) sowie MENNA et al. (1975).

Unter bestimmten kulturellen Bedingungen kann das Masern-Virus in einen defekten Zustand überführt werden, d.h. daß Zellkulturen persistent infiziert bleiben und aus ihnen kein infektiöses Virus mehr freigesetzt wird, obwohl Virus-Antigen nachweisbar bleibt.

Auch bei SSPE-Virus sind Stämme bekannt, die sich in-vitro anders verhalten als die ersten isolierten SSPE-Stämme.

DOI et al. (1972) sowie UEDA et al. (1975) berichten von SSPE-Virus-Isolaten, die auch nach zahlreichen Passagen nicht zellfrei gewonnen werden konnten. Die Viren verhielten sich antigenetisch wie Masern/SSPE-Virus, sie verursachten Syncytia und Einschußkörperchen. In der Zellkultur konnte mit dem Isolat von DOI et al. (1972) eine schwache HämadSORption nachgewiesen werden. Das Isolat von UEDA et al. (1975) hämadSORbierte nicht. Beide Isolate unterschieden sich weiterhin von intaktem SSPE-Virus, indem sie keine hämagglutinierenden Eigenschaften besaßen.

Unterschiede eines dieser Stämme gegenüber der Vermehrung des intakten SSPE-Virus untersuchten DUBOIS-DALCQ et al. (1974), indem sie den defekten DOI-Stamm elektronenoptisch mit den produktiven HALLE- und McCLELLAN-Stämmen verglichen. Unterschiede betrafen vor allem Bildung und Aussehen der Nukleokapside und die Freisetzung der Partikel.

Bei der produktiven (intakten) Infektion liegen Nukleokapsid-Stränge dicht gepackt in Form von Einschußkörperchen vor, während sie bei der latenten Infektion diffus im Zytoplasma verteilt liegen. Größere optische Dichte sah man auch als "Fuzz" rund um die Nukleokapside der produktiv infizierten Zellen, während bei der latenten Infektion die Nukleokapside glatt aussahen.

Diese Nukleokapside sammelten sich in großer Zahl in den Einschlüssen der Syncytien. Durch Überdehnung und Bruch der Zellwand wurden sie in das umgebende Medium abgegeben, wo sie unbehüllt lagen, Nukleokapside aus einer produktiven Infektion dagegen lagerten sich unter der Zellmembran an, von wo aus sie durch Knospung freigesetzt wurden. Gleichartig aussehende Oberflächenprojektionen fanden sich an der Zelloberfläche und an der Virushülle.

Die glatten Nukleokapside der latent infizierten Kulturen lagerten sich nie unter der Zelloberfläche an, sie wurden nie umhüllt, fertige Viruspartikel wurden nie gebildet.

3.2.5. Paramyxovirus 107

Das Paramyxovirus 107 ist in der Form, in der es isoliert wurde, ein defektes Partikel, da es nicht zellfrei gewonnen werden konnte. Es bildet Syncytien sowie Kern- und Plasmaeinschlüsse. Morphologisch unterscheidet es sich nicht von anderen Paramyxoviren.

Dies zeigten BACHMANN et al. (1974) mit Hilfe der Elektronenmikroskopie. Sie fanden im Überstand infizierter CV₁-Zellen Viruspartikel mit 200 - 300 nm Durchmesser, die Nukleokapside enthielten. Die Nukleokapside selbst fanden sich sowohl aufgereiht an der Zelloberfläche, als auch vereinzelt im Überstand der Kultur, Knospung wurde nicht

beobachtet. Nukleokapside hatten Durchmesser von 17 - 20 nm und ein typisches fischgrätenartiges Aussehen. Wie diese Nukleokapside unbehüllt in den Überstand gelangten, wurde nicht geklärt.

4. Eigene Untersuchungen

4.1. Material und Methoden

4.1.1. Virus

Als Virusausgangsmaterial dienten mit Paramyxovirus-107 (BACH-MANN et al. 1975) infizierte Kälberhoden (KH)- und Kälberschilddrüsenzellkulturen (BT), bei denen die Infektion durch Kokultivierung von infizierten Zellen mit nicht infizierten Zellen laufend aufrecht erhalten wurde. Die Zellkulturen waren durch Kokultivierung originaler Gehirnzellkulturen, aus denen man das PMV-107 isoliert hatte, infiziert worden. Da das Virus keine infektiösen Partikel bildete, wurden auf diese Weise infizierte Zellkulturen für die Infektion aller anderen Kulturen verwendet, wenn sie etwa 80% Riesenzellen aufwiesen.

4.1.2. Zellkulturen

Insgesamt wurden 28 verschiedene Zellkulturen auf ihre Empfänglichkeit gegenüber dem Isolat 107 geprüft. Davon waren 19 Primär- oder Sekundärkulturen und 9 permanente Zelllinien.

4.1.2.1. Herstellung der Primärzellkulturen

Zur Verwendung kamen Zellkulturen aus den Organen folgender Spezies:

Rind: Fetale Nieren; Fetale Hoden; Fetale Lungen; Fetale Milz; Schilddrüsen und Gehirn

Pferd: Schilddrüsen

Schaf: Fetale Lungen; Fetale Hoden

Affe: Nieren

Mensch: Fetale Lungenzellen

Hund: Nieren

Kaninchen: Gehirn, Nieren

Meerschweinchen: Fetale Fibroblasten

Hamster: Fetale Fibroblasten

Ratte: Fetale Fibroblasten

Huhn: Fetale Fibroblasten

Die Herstellung der Zellkulturen erfolgte nach Standardverfahren durch Trypsinierung von Organen (MAYR et al. 1974). Alle Organe wurden unter aseptischen Kautelen entnommen und sofort verarbeitet. Für bovine Schilddrüsenzellkulturen (BT) kamen die Organe aus dem Kälberschlachtbetrieb des Schlachthofes München. Der Transport erfolgte in PBS (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco und Vogt), dem 200 mg/l Nebacetin und 4 mg/l Amphotericin zugefügt wurden, um die Zahl der Begleitkeime zu reduzieren. Nach Entfernen der Drüsenkapsel wurden die Schilddrüsen zur Oberflächensterilisation zweimal in 96%igen Alkohol getaucht und abgeflammt, dann in Stückchen von 1-2 mm Kantenlänge zerschnitten und zweimal in PBS gewaschen.

Die gewaschenen Gewebestückchen wurden mit einer 0,25%igen Trypsin-PBS-Lösung (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) versetzt und fraktioniert bei einer Temperatur von 37°C auf einem Magnetrührer trypsiniert. Das erste Trypsinat wurde nach einer Stunde abgenommen und verworfen. Die Abnahme der folgenden Trypsinate erfolgte jeweils nach einer Stunde.

Nach Filtration der Zell-Trypsin-Suspension durch einen 4-6fachen Mullfilter und Aufbewahrung bei 4°C hemmte man die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FKS) zum Trypsinat.

Nach Abschluß des Gewebeaufschlusses wurde die gesamte Zell-Trypsin-Suspension über 10 Minuten bei 800xg zen-

trifugiert. Danach nahm man das Zellsediment in 10ml Medium auf, um 0,1 ml der gewonnenen Zellsuspension mit 1%iger Trypanblaulösung in einer Zählkammer auszuzählen. Zur Anzucht wurden 5×10^5 Zellen/ml Medium benutzt. Die Bebrütungstemperatur betrug 37°C. Falls notwendig, erfolgte ein Mediumwechsel nach 2-3 Tagen. Die Kulturen wuchsen innerhalb von 7 Tagen mit epitheloider Morphologie zu einem dichten Zellrasen aus.

Die Herstellung der fetalen Kälbernieren, Kälbermilz, Kälberhoden und Kälberlungen-Zellkulturen erfolgte in ähnlicher Weise. Die verwendeten Feten hatten ein Alter von 3-4 Monaten.

Auf ein Waschen der Organe in Alkohol und Abflammen wurde verzichtet. Zur Verwendung kam eine 0,25%ige PBS-T-Lösung. Die Trypsinierungszeit betrug 30-45 Minuten bei jeder Fraktion. Die Einsaatdichte war 5×10^5 Zellen/ml. Gehirnzellen wurden ebenfalls durch fraktionierte Trypsinierung gewonnen. Pferdeschilddrüsenzellkulturen wurden wie bovine Schilddrüsenzellen angelegt. Es kamen nur Organe von jüngeren Tieren zur Verwendung, da sich Zellen von über acht Jahre alten Pferden in der Regel nicht anzüchten lassen. Die Einsaatdichte betrug 1×10^6 Zellen/ml. Die Herstellung fetaler Schafungen- und Schafhodenzellkulturen erfolgte in Anlehnung an die bei Rinderfeten verwendete Methode. Die Feten waren etwa 12 Wochen alt. Die Einsaatdichte betrug 5×10^5 Zellen/ml. Affennierenzellsuspensionen und fetale menschliche Lungenfibröblasten wurden als Einschichtzellkultur von Flow-Laboratories, Bonn bezogen. Die Hundenierenzellkulturen stammten von einem etwa 4 Wochen alten Mischlingshund. Nach Entnahme der Organe erfolgte die Trypsinierung mit 0,25%iger PBS-T-Lösung. Die Einsaatdichte betrug 5×10^5 Zellen/ml. Gehirn- und Nierenzellkulturen vom Kaninchen wurden durch fraktionierte Trypsinierung von Gehirnen 4 Tage alter Tiere gewonnen.

Die Zelleinsaatdichte betrug 7×10^5 Zellen/ml. Nach einem Mediumwechsel wuchsen die Kulturen in 8-10 Tagen zu einem dichten Zellrasen aus. Fetale Meerschweinchenfibroblasten wurden am 40. Tag der Trächtigkeit, fetale Rattenfibroblasten am 20. Tag, fetale Mäusefibroblasten und fetale Hamsterfibroblasten am 14. Tag der Trächtigkeit nach Tötung der Muttertiere und Entnahme der Uteri hergestellt. Meerschweinchenfeten mußten enthäutet werden. Bei allen Embryonen wurden Augen und Eingeweide entfernt. Nach Zerkleinerung erfolgte fraktionierte Trypsinierung mit 0,25%iger PBS-T-Lösung bei 37°C und Abnahme der Fraktionen nach jeweils 30 Minuten. Die Einsaatdichte betrug 8×10^5 Zellen/ml. Hühnerfibroblasten wurden nach Standardmethoden gewonnen.

4.1.2.2. Subkulturen

Für die Infektionsversuche diente die erste Subkultur der beschriebenen Primärzellkulturen. Die Ablösung der Zellen von der Glasunterlage erfolgte mit Hilfe einer Saline-Trypsin (0,0625%)-Versen (0,025%)-Lösung (STV) folgender Zusammensetzung:

NaCl	8000 mg	
Glucose	1000 mg	
NaHCO ₃	350 mg	
KCl	400 mg	
Trypsinlösung 1,25%ig		
in Aqua bidest	50 ml	
Versen (EDTA)-Lösung 1%ig		
in Aqua dest.	25 ml	
Aqua dest.	ad 1000 ml	

Nach einmaligem Waschen mit STV wurde der Zellrasen mit 5-10 ml STV überschichtet und etwa 10 Minuten bei 37°C

bebrütet. Danach ließen sich die Zellen leicht abschüteln. Im Anschluß an die Zentrifugation (800xg, 3 Minuten) erfolgte die Einsaat der Zellen in neue Anzuchtgefäße bei einer Teilungsrate von 1:2-3. Als Anzuchtgefäße dienten Vierkantflaschen und Leighton-tubes mit Deckgläschen.

4.1.2.3. Zell-Linien

Zur Verwendung kamen insgesamt neun permanente Zelllinien verschiedener Spezies. Vom Rind stammte die Nierenzelllinie MDBK (ATCC CCL 22), vom Schwein die Nierenzelllinie SK (KASZA et al., 1972), vom Menschen die Amnionlinie AV₃ (ATCC CCL 21) und die Cervixcarcinomlinie HeLa (ATCC, CCL 2), vom Affen (grüne Meerkatzen) stammten die Nierenzelllinien Rita, Vero (ATCC, CCL 81) und CV₁ (ATCC, CCL 70), vom Hund die Nierenzelllinie MDCK (ATCC, CCL 34) und vom Hamster die Babyhamsternierenzelllinie BHK 21, Klon 13 (ATCC, CCL 10).

Die Subkultivierung der Zelllinien erfolgte entsprechend der bei Primärzellen angewandten Methode. Dichtgewachsene Kulturen wurden in einem 3-4 tägigen Rhythmus im Verhältnis 1 : 3 bis 1 : 5 geteilt. Für die Infektionsversuche mit PMV 107 wurden jeweils 3×10^5 Zellen pro ml eingesät.

4.1.3. Medien

Für alle Primärzellkulturen, Subkulturen und Zelllinien wurde Minimal Essential Medium nach EAGLE (1959) mit EARLEScher (EARLE 1934) oder HANKS Salzlösung (HANKS 1948) verwendet. Den Medien wurde zur Anzüchtung der Zellen 5%

fetales Kälberserum (FKS), den Erhaltungsmedien 2% zugesetzt.

Die zugesetzte Antibiotikamenge betrug bei Primärzellen von Schilddrüsen 200 IE Penicillin, 200 µg Streptomycin und 200 µg Neomycin sowie 4 µg Amphotericin pro ml; bei allen anderen Zellkulturen 100 IE Penicillin, 100 µg Streptomycin und 2,5 µg Amphotericin pro ml Medium.

4.2. Infektion von Zellkulturen

Vierkantflaschen mit dichtem Zellrasen der verschiedenen Zellkulturen wurden mit PMV-107-infizierten Rinderschilddrüsen-Zellen infiziert, die etwa 80% Riesenzellen aufwiesen. Zur Einhaltung einheitlicher Versuchsbedingungen wurde jeweils mit 10^4 infizierten Zellen gearbeitet.

Die Infektion erfolgte entweder durch Adsorption der infizierten BT-Zellen an einen dichten Zellrasen und Inkubation nach Mediumzugabe, oder durch Zugabe infizierter Zellen zu abtrysinierten neuen Zellen, mit denen sie dann gemeinsam in ein neues Kulturgefäß eingesät wurden (Kokultivierung). Die Kokultivierungsmethode erwies sich in Vorversuchen als zuverlässig und wurde hauptsächlich verwendet.

Die infizierten Kulturen in den Vierkantflaschen wurden in Abständen von 3 - 4 Tagen regelmäßig bis zur 6. Passage subkultiviert. PMV-107 infizierte CV₁-Zellen wurden regelmäßig weiter passiert, da kaum Cytolyse auftrat. Die Deckglaskulturen dienten nach Fixierung zum Nachweis von cytopathischen Veränderungen und Virusantigen mit Hilfe der Immunofluoreszenztechnik.

Bei Auftreten von Cytolyse nach Infektion erfolgte regelmäßige Zugabe neuer, nicht infizierter Zellen der jeweiligen Zellart zur Testkultur, um die Kultur zu erhalten.

Um auszuschließen, daß es sich bei den antigenhaltigen nachgewiesenen Zellen in einer Kultur nicht um die zur Kokultivierung benutzten infizierten BT-Zellen handelte, erfolgte als Kontrolle die Subkultur der zur Infektion verwendeten BT-Zellen. In der Regel trat eine starke Cytolyse auf, so daß nach der 2. bis 3. Subkultur alle BT-Zellen zerstört waren.

4.3. Nachweis der Virusvermehrung

4.3.1. Auftreten cytopathischer Effekte

Alle Kulturen wurden täglich auf das Auftreten von Riesenzellen und Cytolyse im Nativpräparat untersucht. Zusätzlich erfolgte die Herstellung eines mit Hämatoxilin-Eosin gefärbten Präparates zur Diagnose von Riesenzellen und Einschußkörperchen. Dazu wurden Deckglaskulturen zweimal in PBS gewaschen, 30 min lang mit BOUIN's Lösung fixiert (15 Teile gesättigte Pikrinsäurelösung + 5 Teile Formaldehyd + 1 Teil Eisessig) und anschließend mit Hämatoxilin (8 Minuten) und Eosin (13 Minuten) gefärbt. Nach gründlichem Waschen erfolgte die Einbettung der Präparate auf Objektträgern mit Kanadabalsam.

4.3.2. Antigennachweis mit Hilfe der Immuno- fluoreszenz (IF)

Bei allen IF-Untersuchungen kam die indirekte Methode mit einem spezifischen Kaninchen-anti-107-Serum zur Anwendung. Das Serum war durch zwei Gaben von über Saccharose-Gradienten gereinigtem Virus nach Mischung mit komplettem FREUNDschen Adjuvans hergestellt worden. Es hatte einen Antikörpertiter in der indirekten IF-Methode von 1 : 640. Als anti-Kaninchenserum-Konjugat diente ein Schwein-anti-Kaninchen-Globulin der Fa. Sevac, Prag. Der Färbetiter betrug 1 : 5.

Deckglaskulturen wurden kurz in PBS gewaschen und 10 Minuten lang bei Zimmertemperatur mit Aceton fixiert, dann luftgetrocknet. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte Überschichtung mit 2 Tropfen des 1 : 50 verdünnten Immunserums und Bebrütung der Präparate in einer feuchten Kammer bei 37°C. Anschließend wurden die Kulturen 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen und mit einem Tropfen konjugiertem Antiglobulin überschichtet. Nach weiterer Inkubation bei 37°C über 30 Minuten und 3 x 10 Minuten Waschen erfolgte die Einbettung der Präparate in einer Carbonat-Hydrogencarbonatpuffer-Glycerinlösung (2 Teile Carbonatpuffer, pH 9,5 und 8 Teile Glycerin).

Die Durchsicht der Präparate wurde in einem Leitz-Laborlux-Mikroskop mit Halogenlampe als Lichtquelle im Durchlichtverfahren und Dunkelfeld vorgenommen. Als Filter dienten BG 38 als Erreger- und Interferenzfilter und K 510 als Sperrfilter.

4.4. Untersuchung der Zellkulturen auf Infektiosität

Von jeder zweiten Subkultur der infizierten Zellen wurde eine Vierkantflasche eingefroren (-70°C), aufgetaut, 20 Minuten lang bei 2200xg zentrifugiert und der resultierende Überstand auf Vorhandensein von infektiösem Virus untersucht. Dazu wurden jeweils 0,5 ml des unverdünnten Materials und 0,5 ml einer 10^{-2} Verdünnung in Medium auf dichte Zellrasen von BT-Zellen in Leighton-Tubes mit Deckgläschen pipettiert. Nach einer Adsorptionszeit von 30 Minuten bei Zimmertemperatur erfolgte Zugabe von 1 ml Erhaltungsmedium. Die Bebrütungszeit der Kulturen betrug 6 - 7 Tage bei 37°C . Alle Deckgläschen wurden auf Vorhandensein von cpE (HE-Färbung) und Antigen (IF-Methode) untersucht.

4.5. Virusreinigung und Elektronenmikroskopie

Nach Kokultivierung von BT-Rollerflaschenkulturen mit PMV-107 infizierten BT-Zellkulturen und anschließender Bebrütung erfolgte die Ernte der Kulturen, wenn etwa bei 60% der Zellen Riesenzellbildung auftrat. Der Überstand wurde gesammelt, die Zellen mit einem Gummischaber von der Glasunterlage gelöst und in 10 ml TE-Puffer pro Flasche aufgenommen (TE-Puffer = 0,005 M Tris-HCl und 0,01 M EDTA, pH 7,35). Überstand und Zellfraktion wurden getrennt 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt und anschließend 20 Minuten bei 2200xg zentrifugiert. Danach folgte die Ultrazentrifugation des Materials über 90 Minuten bei 95 000xg (Zentrifuge: Beckman Instruments, Spinco L₂ 65 B). Das Sediment wurde 12 Stunden in 0,5 ml TE-Puffer geweicht, dann resuspendiert und erneut 30 Sekunden mit Ultraschall behandelt.

Von diesem Material kamen 2 ml der Zellfraktion sowie 2 ml des Überstandsmaterials getrennt auf einen Saccharosegradienten mit den Stufen 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% und 65% in TE-Puffer. Die Gradientenzentrifugation wurde in Zellulosenitratröhrchen im SW 40 Rotor 150 Minuten lang bei 73 500xg durchgeführt. Die zwischen 40% und 50% deutlich sichtbare Bande wurde durch seitliche Punktion des Zellulosenitratröhrchens entnommen und 12 Stunden lang bei 4°C gegen TE-Puffer dialysiert. Nach erneuter Dichtegradientenzentrifugation über 360 Minuten in einem linearen 25% bis 60% Saccharosegradienten erfolgte Abnahme und Weiterbehandlung der Bande wie beschrieben.

Das dialysierte Virus diente als Ausgangsmaterial für Infektiositätsuntersuchungen und die Elektronenmikroskopie. Die Infektiositätsprüfung des gereinigten Virus erfolgte durch Verimpfung von 0,1 ml Virusmaterial, von 10^{-1} bis 10^{-4} in Medium verdünnt, auf dichte, in Röhrchen gezüchtete BT-Zellen. Nach Adsorption von 90 Minuten bei 37°C wurde das Virusmaterial abgegossen, Medium aufgegossen und die Kulturen wurden bei 37°C inkubiert. Zell- und Überstandsmaterial wurden getrennt behandelt. Die infizierten Zellen wurden dreimal subkultiviert und mit Hilfe der Immunofluoreszenz auf das Vorhandensein des PMV-107 untersucht.

Für die Elektronenmikroskopie wurden die Netze mit dem vorgereinigten und konzentrierten Virusmaterial beschickt und anschließend mit 2%iger Phosphorwolframsäure pH 7,1 kontrastiert. Die Präparate wurden mit einem Siemens-Elmiskop 19 mit Doppelkondensor, einer Instrumentenvergrößerung von 40 000 und einer Spannung von 80 KV betrachtet.

4.6. Trypsinbehandlung

HOMMA (1973) behandelte in HeLa- und L-Zellen vermehrtes defektes Sendai-Virus - Fehlen der Hämolyse, geringere Infektiosität - mit kristallinem Trypsin und konnte damit das Sendai-Virus wieder intakt bekommen.

Entsprechend HOMMA (pers. Mitteilung) wurden 1 ml hochgereinigtes Virusmaterial mit 4 mg kristallinem Trypsin (in 0,1 ml) versetzt. Die Einwirkungszeit betrug 5 Minuten bei 36°C. Danach hemmte man das Trypsin mit 1 ml FKS. Nach Adsorption des gesamten Materials (2,1 ml) an eine dichtgewachsene Zellkultur (Vierkantflasche) (30 Minuten 37°C), kamen jeweils 18 ml Erhaltungsmedium dazu. Die Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen subkultiviert und auf Virusvermehrung hin untersucht.

5. Ergebnisse

5.1. Virusvermehrung in Zellkulturen unterschiedlicher Spezies

Das Paramyxovirus-107 vermehrte sich in Zellkulturen von acht verschiedenen Spezies. In Zellkulturen von fünf Spezies vermehrte sich das Virus nicht. Es vermehrte sich sowohl in Primär-Zellkulturen als auch in Zelllinien. Virusspezifische Zellveränderungen traten ab der zweiten Subkultur auf. Unterschiede im Auftreten der Zellveränderungen waren nicht an eine Spezies oder an eine bestimmte Zellart gebunden. Z.B. vermehrte sich das Virus in Schaf-Hoden-Zellen sehr schnell, in Schaf-Lungen-Zellen langsam, in Kälber-Lungen-Zellen aber sehr schnell.

In allen Zelllinien vermehrte sich das Virus deutlich schlechter als in bovinen Primär-Zellkulturen. Von neun untersuchten Zelllinien konnte nur in vier eine Virusvermehrung nachgewiesen werden. Bei Primärzellen lag das Verhältnis 19 : 5. Alle Zellkulturen wurden grundsätzlich ab der zweiten Subkultur untersucht, wobei in Betracht gezogen wurde, daß ein Teil der infizierten Zellen noch BT-Zellen des Inokulums waren. Die Zahl der infizierten Zellen nahm aber mit der Zahl der Subkulturen zu und in Vorversuchen war geklärt worden, daß 10^4 infizierte BT-Zellen nach der dritten Subkultur vollständig zerstört waren. Deshalb konnte als sicher angenommen werden, daß alle Zellen, die nach der vierten Subkultur einen cpE zeigten, zu der neu infizierten Zellart gehörten und empfänglich für die Infektion mit dem PMV-107 waren.

Regelmäßig züchten ließ sich das Virus in folgenden Zellkulturen:

<u>Mensch:</u>	Humane embryonale Lungenzellen
<u>Affe:</u>	primäre Affennierenzellen Rita- Vero- CV ₁ -Linie
<u>Rind:</u>	Schilddrüsen fetale Kälbernieren fetale Kälberhoden fetale Kälberlunge fetale Kälbermilz fetale Kälbergehirnzellen MDBK-Linie
<u>Pferd:</u>	Pferdeschilddrüsen
<u>Schaf:</u>	fetale Schaflunge fetale Schafhoden
<u>Hund:</u>	Hundenieren
<u>Meerschweinchen:</u>	fetale Fibroblasten
<u>Goldhamster:</u>	fetale Fibroblasten BHK-Zelllinie

Nicht empfänglich waren:

<u>Mensch:</u>	HeLa- und AV ₃ -Zelllinie
<u>Schwein:</u>	SK-Linie
<u>Hund:</u>	MDCK-Linie
<u>Kaninchen:</u>	Gehirnzellen Nierenzellen
<u>Ratte:</u>	fetale Fibroblasten
<u>Maus:</u>	fetale Fibroblasten
<u>Huhn:</u>	embryonale Fibroblasten

Auffällig war die Empfänglichkeit der humanen Diploidzellen für das PMV-107, während die humanen Zelllinien nicht empfänglich waren, wohl aber alle Affen-Zelllinien.

Von den kleinen Labortieren erwiesen sich nur Hamsterzellen als empfänglich.

5.1.1. Nachweis der Infektion

5.1.1.1. Cytopathische Veränderungen

Im infizierten Nativpräparat waren zahlreiche Riesenzellen sichtbar. Die Riesenzellen umfaßten bis zu 100 Zellkerne. In Rinder-, Schafhodent- und Affenzellen ging die Riesenzellbildung innerhalb von 3-4 Tagen vonstatten. Sie umfaßte 80-90% der Zellkultur. Danach lösten sich die Riesenzellen von der Glasunterlage, die Zellen kontrahierten sich und lösten sich auf. Vollständige Lysis der gesamten Kultur trat bei manchen Zellen nach 2 - 3 Passagen (BT) auf. Sie trat auch nach Inkubation bei 37°C über acht Tage ein (siehe Abb. 2).

Im HE-Präparat zeigten sich die Riesenzellen deutlich, gleichzeitig färbten sich eosinophile Einschlößkörperchen in Kern und Plasma an. Die intranukleären Einschlößkörperchen waren multipel, klein, abgerundet und von einer deutlichen Halo umgeben. Häufig waren 3 - 5 Einschlöße pro Kern zu sehen.

Intrazytoplasmatische Einschlößkörper bestanden aus großen, unregelmäßig geformten eosinophilen Massen. Häufig standen sie sternförmig vom Kern - oder von den Kernen - weg. Sie zeigten in der Regel eine streifenförmige Struktur. Auch sie waren von einer deutlichen Halo umgeben. Intraplasmatische Einschlößkörper gingen stets mit der Vermehrung des PMV-107 einher, Kerneinschlöße nicht unbedingt.

Riesenzellen mit mehr als 10 bis 100 Kernen, die bis zu 90% der Kultur umfassen konnten, traten bei allen Rinderzellen, bei Vero-Zellen und bei fetalen Hamsterfibroblasten frühzeitig nach der Kokultivierung auf. Die Riesenzellen aller übrigen Zellkulturen umfaßten meist 5 - 10 Kerne,

auch wurde nie die gesamte Kultur erfaßt. Rita- und BHK-Zellen sowie Pferdeschilddrüsenzellen wiesen nur vereinzelt Riesenzellen auf.

Plasmaeinschlüsse traten in allen empfänglichen Zellkulturen auf. Ihre Anzahl und Größe korrelierte genau mit der Bildung und Größe der Riesenzellen (siehe Abb. 3).

Das Vorhandensein und die Größe der Kerneinschlüsse variierten je nach Zellart. In BHK- und Ritazellen traten keine klar erkennbaren Kerneinschlüsse auf. In BT und Kälbernieren sowie in Schaflungenzellen und fetalen Hamsterfibroblasten waren sie klein, vereinzelt und traten erst in höheren Subkulturen (Abb. 4) auf. In allen übrigen Zellkulturen waren Kerneinschlüsse multipel und deutlich sichtbar.

Diese Befunde am HE-Präparat ließen sich mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz bestätigen.

Abb. 2. Riesenzelle
der 6. Subkultur
einer mit dem
PMV-107 infizierten
Vero-Zellkultur
(x 100)

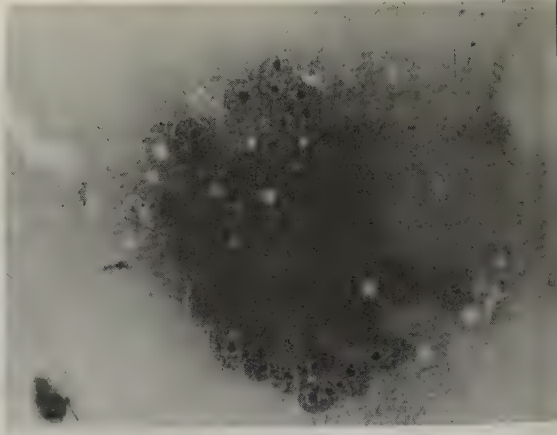


Abb. 3. Plasmaeinschlüsse der 5. Subkultur einer mit dem PMV-107 infizierten Schaflungen-Zellkultur
(x 400)

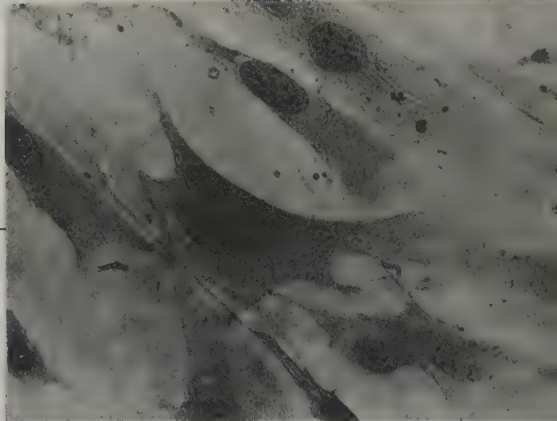
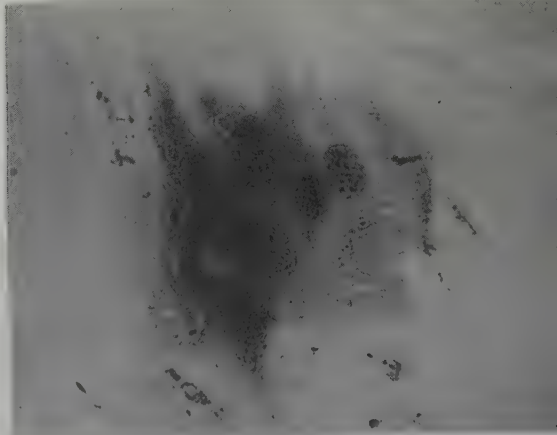


Abb. 4. Kern- und Plasmaeinschlüsse der 6. Subkultur einer mit dem PMV-107 infizierten Vero-Kultur
(x 400)



Tab. 1: Auftreten von Riesenzellen, Kern- und Plasmaeinschlüssen sowie infektiösem Virus in PMV-107 infizierten Zellen

SPEZIES	ZELLART	VIRUS- VERMEH- RUNG	RIESEN- ZELLEN	PLASMA- EINSCHLÜSSE	KERN- EINSCHLÜSSE	VIRUS FREI IM ÜBERSTAND
HENSCH	embryonale Lunge	ja	+++	+++	+++	nicht infektiös
	AV ₃	nein	- -	- -	- -	- -
	HeLa	nein	- -	- -	- -	- -
AFFE	Affen- niere	ja	+++	+++	+++	nicht infektiös
	Rita	ja	++	+	fraglich	nicht infektiös
	Vero	ja	+++	+++	+++	nicht infektiös
	CV ₁	ja	+++	+++	+++	nicht infektiös
	KE	ja	+++	+++	+++	nicht infektiös
KIND	BT	ja	+++	+++	++	nicht infektiös
	KJ	ja	+++	+++	++	nicht infektiös
	KLu	ja	+++	+++	+++	infektiös weiter 10

RAND	MLZ	ja	+++	+++	++++	infektiös Giter 10
	MDCK	ja	+++	+++	++++	
IERD	ETY	ja	+	++	++	
	S-Lu	ja	++++	+++	+	nicht infektiös
SCHAF	S-Ho	ja	+++	++	++	nicht infektiös
	SK	nein	- -	- -	- -	- -
HUND	Niere	ja	++	++	++	nicht infektiös
	MDCK	nein	- -	- -	- -	- -
KALINCHEN MEER- SCHWEIN	Gehirn, Niere	nein	- -	- -	- -	- -
	Fibroblast.	ja	++	++	++	nicht infektiös
HABSTER	Fibroblast.	ja	++++	+++	+	nicht infektiös
	BHK	ja	+++	++	- -	nicht infektiös
KATTE, LAUS	Fibroblast.	nein	- -	- -	- -	- -
	Fibroblast.	nein	- -	- -	- -	- -

Die Kulturen wurden jeweils mit 10^4 107-BT-Zellen infiziert.

Abb. 5. Kern- und
Plasmafluoreszenz
der 15. Subkultur
einer mit dem PMV-
107 infizierten
CV₁-Kultur
(x200)

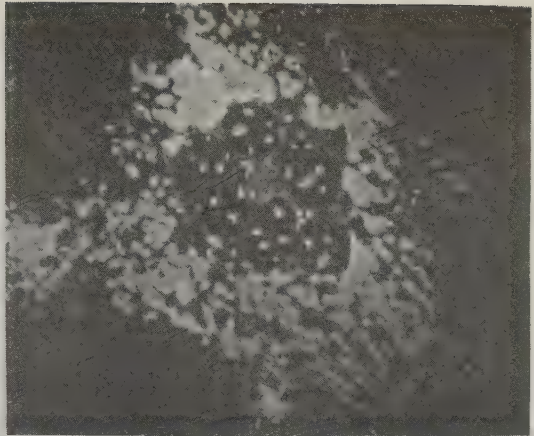
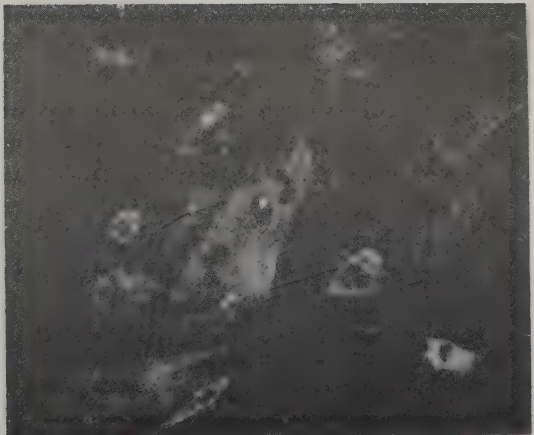


Abb. 6. Kern- und
Plasmafluoreszenz
der 6. Subkultur
einer mit dem PMV-
107 infizierten bo-
vinen Lungenzell-
kultur (x200)



5.2. Untersuchung der Zellkulturen auf Infektiosität

Überstände viruspositiver Kulturen wurden regelmäßig unverdünnt und 10^{-2} verdünnt auf dichte BT-Zellen verimpft. Bei allen Überständen, außer von bovinen Lungen- und Milzzellen waren nach drei Subkulturen weder ein cpE noch Antigen in infizierten Zellen nachweisbar. Infektiöses Virus ließ sich lediglich im Überstand infizierter boviner Lungen- und Milzzellen nachweisen. Nach Verimpfung dieses Materials bildete sich in den BT-Zellen innerhalb von 10-15 Tagen p.inf. ein cpE mit Riesenzellen, Einschlußkörperchen und anschließender cytolyse aus. Dieses Material war auch noch nach Filtration durch einen 450 nm Membranfilter infektiös.

Die Titer von Milz- und Lungenüberstand waren sehr verschieden. Während bei Züchtung in Milzzellen auch nach wiederholten Passagen mit infektiösem, zellfreiem Überstand die Titer niemals höher als 10^2 waren, lagen die Titer bei bovinen Lungenzellen zunächst bei $10^2 - 10^3$. Im Verlauf weiterer Passagen mit unverdünntem und 10^{-2} verdünntem Virus stiegen die Infektiositätstiter auf 10^3 bzw. 10^5 KID₅₀/ml. Auffällig war, daß die Infektiositätstiter nach Passagen mit verdünntem Virusmaterial immer höher lagen als bei unverdünnten Passagen (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Infektionstiter von Viruspassagen mit
zellfreiem Überstand

Passagen Nr.	1	2	3
Überstand von bovinen Milzzellen unverdünnt	$10^{1,75}$	$10^{2,0}$	$10^{2,0}$
Überstand von bovinen Lungenzellen unverdünnt	$10^{2,75}$	$10^{3,0}$	$10^{3,25}$
Überstand von bovinen Lungenzellen 10^{-2} verdünnt	$10^{4,25}$	$10^{4,5}$	$10^{3,5}$

Nach zweimaligem Einfrieren (-70°C) und Auftauen sank der Titer des infektiösen Virus um etwa $0,5 - 1,5 \log_{10}$ ab.

Im Verlauf der Passagen traten erste Riesenzellen 4-6 Tage p. inf. auf. Bei Verwendung von verdünntem Überstand war die Riesenzellbildung regelmäßig um 1 - 2 Tage verzögert.

5.3 Konzentrierung und Untersuchung von Überständen infizierter BT- und BHK-Zellen

In beiden Zellkulturen traten massive cytopathische Veränderungen auf. Freies infektiöses Virus wurde jedoch nicht gebildet. Zur Feststellung, ob Viruspartikel oder Nukleokapside von den infizierten Zellen in den Überstand abgegeben wurden, erfolgte die Konzentrierung von Überständen im Saccharose-Dichtegradienten. Anschließend wurden die Virusfraktionen im Elektronenmikroskop untersucht und durch Überimpfung auf BT-Zellen auf ihre Infektiosität geprüft.

Die Konzentrierung im Saccharose-Gradienten ergab eine deutlich sichtbare Bande zwischen 45% und 50% Saccharose. Dies entspricht einer Dichte von $1,206 - 1,236 \text{ g/cm}^3$.

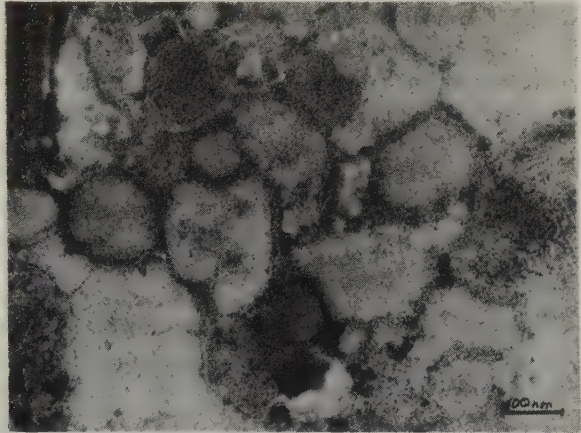
Die Bande wurde elektronenoptisch untersucht. Es ließen sich im Negativkontrastverfahren regelmäßig typische Paramyxovirus-Partikel mit deutlich sichtbarem Nukleokapsid und Hülle darstellen. Die Partikel waren rund bis ovoid mit einem Durchmesser zwischen 120 und 250 nm. Die Virushülle war deutlich zweischichtig und 10 bis 20 nm dick. Einzeln liegende Nukleokapside hatten ein fischgrätenartiges Aussehen. Ihr Durchmesser betrug ca. 17 nm, im Inneren war ein Hohlraum von 5 - 6 nm auszumachen (siehe Abb. 7). Viruspartikel traten in großer Zahl auf.

Nach Überimpfung dieser Fraktionen in Verdünnungen von 10^0 bis 10^{-4} auf dichte BT-Kulturen und anschließender viermaliger Subkultivierung der infizierten Kulturen waren keine spezifischen Veränderungen bzw. kein 107-Antigen in der indirekten Immunfluoreszenz nachweisbar.

Dieses Material wurde auch mit 4mg/ml kristallinem Trypsin behandelt. Nach Verimpfung zeigten sich bis zur sechsten Subkultur weder cpE noch intrazelluläres Antigen.

Abb. 7

Viruspartikel
mit Nukleokap-
siden des
PMV-107



Die Zellfraktionen wurden ebenso wie die Überstandsfraktionen konzentriert. Aus der Bande zwischen 40% und 50% Saccharose (Dichten: 1,420 und 1,236 g/cm³) ließen sich elektronenoptisch Nukleokapside nachweisen.

6. Besprechung der Ergebnisse

Das für PMV-107 gefundene weite in vitro-Wirtsspektrum steht in Übereinstimmung mit dem bei anderen Paramyxoviren gefundenen Spektrum. Auch die Viren der Masern-Staupe-Rinderpest-Gruppe vermehren sich in einer Reihe heterologer Wirtssysteme in vitro, wobei das Wirtsspektrum von Staupevirus im Vergleich zum PMV-107 kleiner, das von Masern- und Rinderpestvirus größer ist (APPEL und GILLESPIE, 1972; PLOWRIGHT, 1968; WATERSON, 1965). Allen gemeinsam ist die Vermehrung in Zelllinien von grünen Meerkatzen (Vero, CV₁), die sich daher für Vergleichsuntersuchungen besonders eignen.

Auffällig ist die Unempfindlichkeit von humanen und caninen Zelllinien für PMV-107, obwohl sich das Virus in primären und sekundären Zellen beider Spezies gut vermehrt. Gründe für dieses Verhalten zu finden, ist schwierig, obwohl seit langem bekannt ist, daß die Empfänglichkeit permanenter Zelllinien im Vergleich zu Primärkulturen häufig verändert ist (MAYR et al., 1974).

Bei der Infektion von Zellkulturen verschiedener Spezies mit Paramyxoviren lassen sich unterschiedliche Infektionsverläufe beobachten. Es kann einmal zu cytolytischen, produktiven Infektionen kommen, bei denen Cytolyse auftritt und infektiöses Virus gebildet wird. Diese Verlaufsform der Infektion in-vitro wird am häufigsten beobachtet. Daneben treten nichtproduktive cytolytische Infektionen auf, bei denen ein cytopathischer Effekt der Virusvermehrung parallel läuft, aber kein infektiöses Virus produziert wird, z.B. bei bestimmten SSPE-Stämmen (BURNSTEIN et al., 1974), wobei in periodischen Abständen ein geringer CpE auftrat, ohne daß infektiöses Virus nachweisbar

war. Eine dritte Verlaufsform ist die persistente, nicht-produktive Infektion, die hauptsächlich bei Masern- und SSPE-Viren (KNIGHT et al., 1972; ter MEULEN et al., 1972c, RUSTIGIAN, 1966), aber auch bei anderen Paramyxoviren wie SV-5 (COMPANS et al., 1964, HOLMES et al., 1965) beobachtet werden kann. Diese Infektionen können in der Regel nach Kokultivierung mit anderen Zellsystemen, meist Affennierenzellen, in eine produktive, lytische Infektion überführt werden. Alle drei Verlaufsformen der Infektion ließen sich auch bei Paramyxovirus-107-infizierten Zellkulturen finden.

Der lytische Effekt der Infektionen mit dem PMV-107 entspricht dem normalen Verlauf von Infektionen mit Masern-, Staupe- und Rinderpestvirus in empfänglichen Zellsystemen. Die cytopathischen Veränderungen waren sich ebenfalls ähnlich. Vorherrschend war in den meisten Zellsystemen, die mit PMV-107 infizierten Zellen kokultiviert wurden, die nicht-produktive, cytolytische Infektion. Infektiöses Virus konnte in diesen Kultursystemen zellfrei nicht nachgewiesen werden, obwohl Viruspartikel und Nukleokapside intra- und extrazellulär regelmäßig in elektronenmikroskopischen Präparaten gefunden wurden. Eine produktive, cytolytische Infektion, d.h. Virusvermehrung mit Bildung infektiöser Partikel wurde nur nach Kokultivierung PMV-107 infizierter Zellen mit fetalen Rinderlungen- und Rindermilzzellen beobachtet.

Die Mechanismen für die Produktion von infektiösem Virus in diesen Zellsystemen sind unbekannt, sind aber mit ähnlichen Befunden bei der Vermehrung von SV-5 (COMPANS et al., 1964) und SSPE-Virus (ter MEULEN et al., 1972c) zu vergleichen. So wurden Infektionen mit verschiedenen SSPE-

Virusstämmen erst produktiv, nachdem Gehirnzellen von Biopsien SSPE-infizierter Patienten mit HeLa-(HORTA-BARBOSA et al., 1969) oder BSC-1- bzw. CV₁-(PAYNE et al., 1969; KATZ et al., 1969)-Zellen kultiviert wurden. Daß dabei eventuell eine bestimmte Abhängigkeit von der Art des Wirtszellsystems auftreten kann, zeigen die Untersuchungen an nichtproduktiven SSPE-Stämmen von DOI et al. (1972) sowie UEDA et al. (1975), deren Isolate auch nach mehreren Kokultivierungen mit BSC-1 und HeLa-Zellen kein infektiöses, zellfreies Virus bildeten. Dies läßt entweder darauf schließen, daß das "passende" Zellsystem noch nicht gefunden worden ist, oder aber, daß die Virusstämme einen defekten Vermehrungszyklus aufweisen.

Ter MEULEN et al. (1972) vermuten eine virusbedingte Membranveränderung der Wirtszelle. Warum sie nur bei einigen Zellen und einigen SSPE-Stämmen auftrat, ist ungeklärt.

In der Affennierenzelllinie CV₁ ließ sich eine persistente, nichtproduktive PMV-107-Infektion nach Kokultivierung etablieren, die über mindestens 70 Subkulturen stabil war. Die Eigenschaften dieser CV₁-Zellen waren mit denen anderer persistenter Paramyxovirus-Zellsysteme, insbesondere mit denen von Masern (KNIGHT et al., 1972; MENNA et al., 1975) und SSPE (ter MEULEN et al., 1972, DOI et al., 1972; UEDA et al., 1975) vergleichbar. Infektiöses Virus wurde in PMV-107-CV₁-System nicht gefunden. Die Infektion war aber immer begleitet von dem Auftreten einiger Riesenzellen, die nicht lysierten. Je nach Passage waren zwischen etwa 20% bis 80% aller Zellen infiziert. BURNSTEIN et al. (1974) fanden unter ähnlichen Umständen in SSPE-virusinfizierten BSC-1-Zellen ebenfalls Riesenzell-

bildung in periodischen Abständen. Bei Masernvirus-Persistenz in bestimmten Zellkulturen kann Riesenzellbildung vollständig fehlen, Antigen ist aber in einer großen Zahl von Zellen vorhanden (KNIGHT et al., 1972; MENNA et al., 1975).

In diesem Zusammenhang werden verschiedene Defekte, die bei der Virusvermehrung auftreten können, diskutiert. Defekte Viruspartikel sind für eine Reihe verschiedener Virusarten bekannt (HUANG, 1973). Allen defekten Virusystemen gemeinsam ist, daß grob morphologisch vollständig erscheinende Viruspartikel gebildet werden. Biologisch äußert sich der Defekt darin, daß die Partikel für Zellkulturen nicht infektiös sind. Auch bei der Vermehrung des PMV-107 ließen sich Hinweise für das Vorliegen derartiger Defekte finden. Elektronenoptisch wurden große Mengen Viruspartikel in Überständen von PMV-107-infizierten BHK- und Rinderschilddrüsenzellen nachgewiesen, die nicht infektiös waren. Welcher Art der Defekt ist, konnte nur indirekt ermittelt werden. Da sich durch eine Behandlung mit Trypsin keine Aktivierung ähnlich wie bei defektem Sendaivirus (HOMMA und OHUCHI, 1973) erzielen ließ, handelt es sich offensichtlich nicht um eine defekte enzymatische Spaltung eines Hüllglykoproteins des Virus (SCHEID und CHOPPIN, 1974), sondern vermutlich um einen genetischen Defekt, vergleichbar mit den im Masernvirussystem gefundenen defekten Partikeln (HALL und MARTIN, 1974a). Ob sich beim PMV-107-System infektiöse und defekte Partikel durch Dichteunterschiede auszeichnen, müssen weitere Untersuchungen klären.

Der vorläufige Befund, daß beim PMV-107 nach unverdünnten zellfreien Viruspassagen ein geringerer Infektiosität

tätstiter nachweisbar ist, als nach verdünnten Viruspassagen, scheint darauf zu deuten, daß die defekten Partikel eine Interferenz induzieren. Derartige Aktivitäten treten regelmäßig bei anderen defekten Virus-systemen wie VSV (HUANG, 1973), Poliovirus (COLE und BALTIMORE, 1973) oder Masernvirus (HALL und MARTIN, 1974a, PARFANOVICH, 1971) auf.

7. Zusammenfassung

Es wird über Wirtsspektrum und in-vitro Eigenschaften eines neuen defekten Paramyxovirus (Isolat 107) berichtet. Das Virus vermehrt sich nach Kokultivierung in Zellkulturen von Mensch, Affe, Rind, Pferd, Schaf, Hund, Hamster und Meerschweinchen. In Kulturen von Schwein, Kaninchen, Ratte, Maus und Huhn vermehrte es sich nicht. Es vermehrt sich sowohl in Primär-Zellkulturen als auch in Zelllinien. Die Infektion der CV₁-Zelllinie führte zu einer persistenten Infektion. Optimal vermehrt sich das Virus in primären bovinen Zellkulturen.

Die Virusvermehrung verlief mit einem CpE, der Syncytien, Kern- und Plasmaeinschlüsse sowie Lysis verursachte. Antigen wurde in Zellkulturen, in denen sich das Virus vermehrte, mit Hilfe der indirekten Immunofluoreszenz nachgewiesen. Die spezifische Fluoreszenz war in Kern und Plasma sichtbar.

In gereinigten Viruspräparationen aus bovinen Schilddrüsenzellen und BHK-Zellen ließen sich elektronenoptisch typische Paramyxo-Nukleokapside und Viruspartikel sichtbar machen. Gereinigte Viruspartikel waren nicht infektiös für bovine Schilddrüsenzellen. Sie wurden auch nach Trypsinbehandlung nicht infektiös.

Im Überstand von zwei bovinen Zellkulturen (embryonale Lunge, embryonale Milz) war infektiöses Virus mit niedrigen Infektionstitern vorhanden. In allen übrigen Zellkulturen war die Infektiosität zellgebunden.

Nach Verimpfung infektiöser Überstände von embryonalen Kälberlungen in 10⁻²-Verdünnungen resultierten höhere Infektiositätstiters als bei unverdünnten Viruspassagen.

Die Befunde werden im Zusammenhang mit dem Auftreten defekter Partikel bei anderen Virusarten diskutiert.

Summary

Host range and in-vitro properties of a new defective paramyxovirus (isolate 107) are reported. After cocultivation the virus grew in cell cultures derived from man, monkey, cattle, horse, sheep, dog, hamster and guinea pig, but not in cultures from pig, rabbit, rat, mouse and chicken.

Growth occurred in primary cell-cultures as well as in cell-lines. Infection of the CV₁-celline lead to a persistent infection. Virus growth was optimal in primary bovine cell cultures.

Replication was accompanied by CPE, with syncytia, nuclear and cytoplasmic inclusion bodies and lysis. Viral antigen could be demonstrated in permissive cell cultures by the indirect immunofluorescence technique. Nuclear and cytoplasmic fluorescence was demonstrated.

In purified preparations from infected bovine thyroid cells and BHK-cells, typical paramyxo-nucleocapsids and particles were demonstrable by electron microscopy. Purified particles were not infectious for bovine thyroid cells. They also did not become infectious after trypsin treatment.

Infectious virus with low infectivity titres was obtained from the supernatant of two bovine cell cultures (fetal lung, fetal spleen). In all other cultures infectivity remained cell-bound.

Passages of the infectious supernatant from fetal bovine lung in 10^{-2} dilutions resulted in higher infectivity titres than after undiluted passages. The results are discussed in connection with the appearance of defective particles in other virus species.

8. Literaturverzeichnis

- ALMEIDA, J.D. und A.P. WATERSON, 1969: A morphological and theoretical consideration of the von MAGNUS phenomenon.
Microbios 1A, 9.
- APPEL, M.J.G. and J.H. GILLESPIE, 1972: Canine distemper virus.
Virology Mon. 11, 1.
- BACHMANN, P.A., V. ter MEULEN, G. JENTSCH, M. APPEL, Y. IWASAKI, R. MEYERMANN, H. KOPROWSKI and A. MAYR, 1975: Sporadic bovine meningo-encephalitis - isolation of a paramyxovirus.
Arch.Virol. 48, 107.
- BARBANTI-BORDANO, G., S. OYANAGI, M. KATZ and H. KOPROWSKI, 1970: Presence of two different viral agents in brain cells of patients with subacute sclerosing panencephalitis.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 134, 230.
- BAUBLIS, J.V. and F.E. PAYNE, 1968: Measles antigen and syncytium formation in brain cell cultures from subacute sclerosing panencephalitis (SSPE).
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 129, 593.
- BLOUGH, H.A. and J.P. MERLIE, 1970: The lipids of incomplete influenza virus.
Virology 40, 685.
- BROWN, F., S.J. MARTIN, B. CARTWRIGHT and J. CRICK, 1967: The ribonucleic acid of defective and interfering components of vesicular stomatitis virus.
J.gen.Virol. 1, 479.

- BURNSTEIN, T., L.B. JACOBSEN and W. ZEMAN, 1974:
Persistent infection of BSC-1 cells by defective measles virus derived from subacute sclerosing panencephalitis.
Infect.Immun. 10, 1378.
- BUSSELL, R.D. and D.J. WATERS, 1974: Measles, canine distemper and respiratory syncytial virions and nucleocapside. A comparative study of their structure, polypeptide and nucleic acid composition.
Med.Microbiol.Immunol. 160, 105.
- COLE, C.N., S. SMOLER, P.J. WIMMER and D. BALTIMORE, 1971: Defective interfering particles of poliovirus. I. Isolation and physical properties.
J.Virol. 7, 478.
- COLE, C.N. and D. BALTIMORE, 1973: Defective interfering particles of poliovirus. II. Nature of the defect.
J.molec.Biol. 76, 325.
- COLE, C.N. and D. BALTIMORE, 1973: Defective interfering particles of poliovirus. III. Interference and enrichment.
J.molec.Biol. 76, 345.
- COMPANS, R.W., K.V. HOLMES, S. DALES and P.W. CHOPPIN, 1964: An electron microscopic study of moderate and virulent virus cell interactions of the parainfluenza virus SV 5.
Virology 30, 411.
- CRICK, J. and F. BROWN, 1974: An interfering component of rabies virus which contains RNA.
J.gen.Virol. 22, 147

- DARNELL, M.B. and H. KOPROWSKI, 1974: Genetically determined resistance to infection with group A arboviruses. II. Increased production of interfering particles in cell cultures from resistant mice. *J.inf.Dis.* 129, 248.
- DOI, Y., T. SANPE, M. NAKAJEMA, S. OKAWA, T. KATOH, H. ITOH, T. SATO, K. OGUCHI, T. KUMANISHI and T. TSUBAKI, 1972: Properties of a cytopathic agent isolated from a patient with subacute sclerosing panencephalitis in Japan. *Jap.J.Med.Sci.Biol.* 25, 321.
- DOYLE, M. and J.J. HOLLAN, 1973: Prophylaxis and immunization in mice by use of virus-free defective T particles to protect against intracerebral infection by vesicular stomatitis virus. *Proc.nat.Acad.Sci.* 70, 2105.
- DUBOIS-DALCO, M., L.H. BARBOSA, R. HAMILTON and J.L. SEVER, 1974: Comparison between productive and latent subacute sclerosing panencephalitis viral infections in vitro. *Lab.Invest.* 30, 241.
- EAGLE, H., 1959: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130, 432.
- EARLE, W.R., 1934: A technique for adjustment of oxygen and carbon dioxide tension and hydrogen ion concentration in tissue cultures planted in Carrel flasks. *Arch.exp.Zellforsch.* 16, 116.
- EHRNST, A., L. WEINER and E. NORRBY, 1974: Fluctuation and distribution of measles virus antigens in chronically infected cells. *Nature* 248, 691.

- ENDERS, J.F. and T.C. PEEBLES, 1954: Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 86, 277.
- FIELDS, B.N., 1972: Genetic manipulation of reovirus - a model for modification of disease.
New Engl.J.Med. 287, 1926.
- HACKETT, A.J., F.L. SCHAFFER and S.H. MADIN, 1967: The separation of infectious and noninterfering particles in vesicular stomatitis virus preparations.
Virology 31, 114.
- HALL, W. and S.J. MARTIN, 1973: Purification and characterization of measles virus.
J.gen.Virol. 19, 175.
- HALL, W., S.J. MARTIN and E. GOULD, 1974a: Defective interfering particles produced during the replication of measles virus.
Med.Microbiol.Immunol. 160, 143.
- HALL, W. and S.J. MARTIN, 1974: The biochemical and biological characteristics of the surface components of measles virus.
J.gen.Virol. 22, 363.
- HALL, W. and V. ter MEULEN, 1975: Biochemical comparison of SSPE and measles virus.
Proc. 3. International Congress of Virology, September 10-17, 1975.
- HAMILTON, R., L.H. BARBOSA and M. DUBOIS-DALCO, 1973: Subacute sclerosing panencephalitis measles virus: Study of biological markers.
J.Virol. 12, 632.

- HANKS, J.H., 1948: The longevity of chick tissue cultures without removal of medium.
J.cel..comp.Physiol. 31, 235.
- HERNDON, R.M. and L.J. RUBINSTEIN, 1968: Light and electron microscopy observations on the development of viral particles in the inclusions of Dawsons's encephalitis (subacute sclerosing panencephalitis)
Neurology 18, 8.
- HOLLAND, J.J., 1974: Slow, inapparent and recurrent viruses.
Scientific Amer. 230, 32.
- HOLLAND, J.J. and L.P. VILLARREAL, 1974: Persistent non-cytocidal vesicular stomatitis virus infections mediated by defective T particles that suppress virion transcripase.
Proc.nat.Acad.Sci. 71, 2956.
- HOLMES, K. and P.W. CHOPPIN, 1965: On the role of the response of the cell membrane in determining virus virulence.
Fed.Proc. 24, 571.
- HOMMA, M. and M. OHUCHI, 1973: Trypsin action on the growth of Sendai virus in culture cells.
J.Virol. 12, 1457.
- HORTA-BARBOSA, L., J. SEVER and W. ZEMAN, 1969:
Subacute sclerosing panencephalitis: Isolation of measles virus from a brain biopsy.
Nature 221, 974.
- HORTA-BARBOSA, L., R. HAMILTON, R. TRAUB, A. LEY and J.L. SEVER, 1970: Some characteristics of SSPE measles virus.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 134, 17.

- HUANG, A.S., J.W. GREENAWALT and R.R. WAGNER, 1966a:
Defective T particles of vesicular stomatitis
virus. I. Preparation, morphology and some
biological properties.
Virology 30, 161.
- HUANG, A.S. and R.R. WAGNER, 1966b: Defective T particles
of vesicular stomatitis virus. II. Biological
role in homologous interference.
Virology 30, 173.
- HUANG, A.S. and D. BALTIMORE, 1970: Defective viral
particles and viral disease process.
Nature 226, 325.
- HUANG, A.S., 1973: Defective interfering viruses.
Ann.Rev.Microbiol. 27, 101.
- HUMMELER, K., H. KOPROWSKI and T.J. WIKTOR, 1967:
Structure and development of rabies virus in
tissue culture.
J.Virol. 1, 152.
- KASZA, L., J.A. SHADDUCK and G.J. CHRISTOFINIS, 1972:
Establishment, viral susceptibility and bio-
logical characteristics of a swine kidney cell
line SK-6.
Res.Vet.Sci. 13, 46.
- KATZ, M., H. KOPROWSKI and S.H. TUCKER, 1968: Transmission
of encephalitogenic agents from brains of
patients with subacute sclerosing panencepha-
litis to ferrets.
New Engl.J.Med. 279, 793.
- KATZ, M., S. OYANAGI and H. KOPROWSKI, 1969a: Subacute
sclerosing panencephalitis, structures resembling
myxovirus nucleocapside in cells cultured from
brains.
Nature 222, 888.

- KATZ, M., L.B. RORKE, W.S. MASLAND, G. BARBANTI-BORDANO and H. KOPROWSKI, 1969b: Subacute sclerosing panencephalitis: Isolation of a virus encephalitogenic for ferrets.
J.inf. Dis. 121, 188.
- KILEY, M.P. and F.E. PAYNE, 1974: Evidence of precursors of defective measles virus.
Med.Microbiol.Immunol. 160, 91.
- KILEY, M.P., R.H. GRAY and F.E. PAYNE, 1974: Replication of measles virus: Distinct species of short nucleocapsids in cytoplasmic extracts of infected cells.
J.Virol. 13, 721.
- KINGSBURY, D.W., A. PORTNER and R.W. DARLINGTON, 1970a: Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic viral RNA's.
Virology 42, 857.
- KINGSBURY, D.W. and A. PORTNER, 1970b: On the genesis of incomplete Sendai virions.
Virology 42, 872.
- KINKELIN, P. de, M. Le BERRE et G. LENOIS, 1974: Rhabdovirus des poissons. I. Propriétés in-vitro du virus de la maladie route de l'alevin de brochet.
Annal.Microbiol. 125 A, 93.
- KINKELIN, P. de, M. Le BERRE et G. LENOIS, 1974: Rhabdovirus des poissons. II. Propriétés in-citro du virus de la viremie printanniere de la carpe.
Annal.Microbiol. 125 A, 113.
- KNIGHT, P., R. DUFF and F. RAPP, 1972: Latency of human measles virus in hamster cells.
J.Virol. 10, 995.

- KNIGHT, P., R. DUFF, R. GLASER and F. RAPP, 1974:
Characteristics of the release of measles virus
from latently infected cells after co-cultiva-
tion with BSC-1 cells.
Intervirolog. 2, 287.
- KOPROWSKI, H., 1954: Biological modification of rabies
virus as a result of its adaptation of chicks
and developing chick embryos.
Bull.Wld.Hlth.Org. 10, 709.
- KOPROWSKI, H., J. BLACK and D.J. NELSEN, 1954: Studies
on chick embryo adapted rabies virus. IV. Further
changes in pathogenich properties following
prolonged cultivation in the developing chick
embryo.
J.Immunol. 72, 94.
- KUWERT, E., U. BÖHME, K.G. LICKFELD und W. BÖHME, 1972:
Zur Oberflächenstruktur des Tollwutvirion (TWV).
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 219, 39.
- LEHMANN-GRUBE, F., W. SLENCZKA and R. TEES, 1969: A per-
sistent and inapparent infection of L cells
with the virus of lymphocytic choriomeningitis.
J.gen.Virol. 5, 63.
- LIEF, F.S. and W. HENLE, 1956: III. Decreased incorpora-
tion of S antigen into elementary bodies of
increasing incompleteness.
Virology 2, 782.
- MAENO, K., T. YOSHIDA, M. IINUMA and Y. MATSUMOTO, 1970:
Isolation of hemagglutinin and neuraminidase
subunits of hemagglutinating virus of Japan.
J.Virol. 6, 492.

- MAGNUS, P.v., 1952: Propagation of the PR 8 strain of influenza A virus in chick embryos. IV. Studies involved in the formation of incomplete virus upon serial passage of undiluted virus. Acta.path.microbiol.scand. 30, 311.
- MAGNUS, P.v., 1954: Incomplete forms of influenza virus. Adv.virus.Res. 2, 59.
- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN, 1974: Virologische Arbeitsmethoden Bd. I. G. Fischer Verlag, Stuttgart.
- MELNICK, J.L. and R.M. McCOMBS, 1966: Classification and nomenclature of animal viruses. Progr.med.Virol. 8, 400.
- MENNA, J.H., A.R. COLLINS and D. FLANAGAN, 1975: Characterization of an in vitro persistent state measles virus infection. Infect.Immun. 11, 152.
- MEULEN, V. ter, Y. KÄCKELL, D. MÜLLER, M. KATZ and R. MEYERMANN, 1972a: Isolation of infectious measles virus in measles encephalitis. Lancet I, 1172.
- MEULEN, V. ter, M. KATZ, Y.M. KÄCKELL, G. BARBANTI-BORDANI, H. KOPROWSKI and E.H. LENNETTE, 1972a: Subacute sclerosing panencephalitis: In vitro characterization of viruses, isolated from brain cells in culture. J.inf.Dis. 126, 11.
- MEULEN, V. ter, H. KOPROWSKI, Y. IWASAKI, Y.M. KÄCKELL and D. MÜLLER, 1972c: Fusion of cultured multiple sclerosis brain cells with indicator cells: Presence of nucleocapsids and virions and isolation of parainfluenza type virus. Lancet II, 1.

- MEULEN, V. ter, M. KATZ and D. MÜLLER, 1972d: Subacute sclerosing panencephalitis.
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 57, 1.
- NAKAI, T., F.L. SHAND and A.F. HOWATSON, 1969: Development of measles virus in vitro.
Virology 38, 50.
- NGAN, J.S.C., A.F. HOLLOWAY and D.V. CORMACK, 1974: Temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus: Comparison of the in vitro RNA polymerase defects of group I and group IV mutants.
J.Virol. 14, 765.
- NONOYAMA, M. and A.F. GRAHAM, 1970: Appearance of defective virions in clones of reovirus.
J.Virol. 6, 693.
- NONOYAMA, M., Y. WATANABE and A.F. GRAHAM, 1970: Defective virions of reovirus.
J.Virol. 6, 226.
- NORRBY, E. and B. HAMMARDKJÖLD, 1972: Structural components of measles virus.
Microbios 5, 17.
- ÖRVELL, C. and E. NORRBY, 1974: Further studies on the immunologic relationships among measles, distemper and rinderpest virus.
J.Immunol. 113, 1850.
- PALMA, E.L. and A.S. HUANG, 1974: Cyclic production of vesicular stomatitis virus caused by defective interfering particles.
J.inf.Dis. 129, 402.
- PALMA, E.L., S.M. PERLMAN and A.S. HUANG, 1974: Ribonucleic acid synthesis of vesicular stomatitis virus.
J.molec.Biol. 85, 127.

- PARFANOVICH, M., B. HAMMARSKJÖLD and E. NORRBY, 1971:
Synthesis of virus-specific RNA in cells infected with two different variants of measles virus.
Arch.ges.Virusforsch. 35, 38.
- PAYNE, F.E., J.V. BAUBLIS and H.H. ITABASHI, 1969:
Isolation of measles virus from cell cultures of brain from a patient with subacute sclerosing panencephalitis.
New Engl.J.Med. 281, 585.
- PEDERSEN, I.R., 1973: Different classes of ribonucleic acid isolated from lymphocytic choriomeningitis virus.
J.Virol. 11, 416.
- PELEG, J. and V. STOLLAR, 1974: Homologous interference in Aedes aegypti cell cultures infected with Sindbis virus.
Arch.ges.Virusforsch. 45, 309.
- PERRAULT, J. and J.J. HOLLAND, 1972: Absence of transcriptase activity or transcription-inhibiting ability in defective interfering particles of vesicular stomatitis virus.
Virology 50, 159.
- PETRIC, M. and L. PREVEC, 1970: Vesicular stomatitis virus - a new interfering particle, intracellular structures, and virus-specific RNA.
Virology 41, 615.
- PFAU, C.J., 1974: Biochemical and biophysical properties of the arenaviruses.
Progr. med. Virol. 18
- PLOWRIGHT, W., 1968: Rinderpest virus.
Virology Mon. 3, 87.

- POPESCU, M., 1975: LCM virus interference.
Proc. 3. International Congress of Virology
September 10-17, 1975, Madrid.
- RUSTIGIAN, R., 1966: Persistent infection of cells in culture by measles virus. I. Development and characteristics of HeLa sublines persistently infected with complete virus.
J.Bacteriol. 92, 1792.
- SCHEID, A. and P.W. CHOPPIN, 1974: Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus.
Virology 57, 475.
- SCHLESINGER, S., B. WEISS, D. GORAN and M. SCHLESINGER, 1974: Formation of RNA and protein in cells infected with standard and defective sindbis virus.
Med.Microbiol.Immunol. 160, 311.
- SCHLUEDERBERG, A., 1971: Measles virus RNA.
Biochem.biophys.Res.Comm. 42, 1012.
- SCHUERCH, A.R., T. MATSUHISA and W.K. JOKLIK, 1974: Temperature-sensitive mutants of reovirus. IV. Mutant ts 447 and ts 556 particles that lack either one or two genome RNA segments.
Interviol. 3, 36.
- SCHUMACHER, H.P., P. ALBRECHT and N.M. TAURASO, 1972: Markers for measles virus. II. Tissue culture properties.
Arch.ges.Virusforsch. 36, 296.
- SERVAAS, L.H., M.D. NOTERMANS, F.J. WILLEM, M.D. TIJL, F.T.C. WILLEM and J.L. SLOOFF, 1973: Experimentally induced subacute sclerosing pan-

encephalitis in young dogs.

Neurology 23, 543.

STANECK, L.D., R.S. TROWBRIDGE, R.M. WELSH, E.A. WRIGHT
and C.J. PFAU, 1972: Arenaviruses, cellular
response to long-term in vitro infection with
parana- and lymphocytic choriomeningitis
viruses.

Infect.Immun. 6, 444.

THEIN, P., A. MAYR, V. ter MEULEN, H. KOPROWSKI, M.Y.
KÄCKELL, D. MÜLLER and R. MEYERMANN, 1972:
Subacute sclerosing panencephalitis. Trans-
mission of the virus to calves and lambs.
Arch. Neurol. 27, 540.

UEDA, S., Y. OKUNO, Y. OKUNO, Y. HAMAMOTO and H. OHYA,
1975: Subacute sclerosing panencephalitis.
Isolation of a defective variant of measles
virus from brain obtained at autopsy.
Biken J. 18, 113.

WATERS, D.J. and R. H. BUSSELL, 1973: Polypeptide com-
position of measles and canine distemper virus.
Virology 55, 554.

WATERS, D.J. and R.H. BUSSELL, 1974: Isolation and com-
parative study of the nucleocapsids of measles
and canine distemper viruses from infected cells.
Virology 61, 64.

WATERSON, A.P., 1965: Measles virus.
Arch.ges.Virusforsch. 16, 57.

WELSH, R.M., C.M. O'CONNELL and C.J. PFAU, 1972:
Properties of defective lymphocytic chorio-
meningitis virus.
J.gen.Virol. 17, 355.

YEH, J., 1973, Characterization of virus-specific
RNA's from subacute sclerosing panencephalitis
virus-infected CV₁-cells.
J.Virol. 12, 962.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich für die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes an dieser Stelle danken.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn P.D. Dr. P.A. Bachmann für die intensive wissenschaftliche Betreuung und das freie Arbeitsklima.

Während der Anfertigung der Dissertation wurde ich durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungs-gesetz unterstützt, wofür ich mich bedanken möchte.

Lebenslauf

Am 30. 3. 1948 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Jürgen Pfeil und seiner Ehefrau Rosemarie, geb. Schendel in Wittenburg/Mecklenburg geboren.

Das Abitur legte ich am 3.2.1967 am Gymnasium für Jungen und Mädchen in Hamburg-Rahlstedt ab.

Nach einjährigem Biologiestudium in Tübingen studierte ich in München Veterinärmedizin.

Das Studium beendete ich im Herbst 1973 mit dem Staatsexamen.

Bamberger Fotodruck *Schadel & Wehle*
GmbH & Co. KG.
86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str. 9b · Tel. 0951/21617 [5 4414]